

**Eine Struktur- und Funktionsanalyse der floralen Salizylsäure-
Carboxyl-Methyltransferase aus *Hoya carnos* R. Br.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Diana Rohrbeck

Rostock, Januar 2012

Gutachter: Prof. Dr. Birgit Piechulla
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

Prof. Dr. Birgit Dräger
Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Tag der Einreichung: 30.01.2012

Tag der Verteidigung: 16.07.2012

Inhalt

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	X
1.	Einleitung	1
1.1.	Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt	1
1.1.1.	Bedeutung von Benzoesäure und ihren Derivaten.....	1
1.2.	Methyltransferasen der SABATH Gruppe.....	2
1.3.	Ziel der Arbeit.....	5
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Material	8
2.1.1.	<i>Escherichia coli</i> Bakterienstämme mit Genotyp.....	8
2.1.2.	Plasmide.....	8
2.1.3.	Oligonukleotidprimer	9
2.1.4.	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	9
2.2.	Methoden	10
2.2.1.	Mutagenese nach STRATAGENE	10
2.2.1.1.	Generierung von Mutagenese-Primern	11
2.2.1.2.	PCR zur Mutagenese.....	11
2.2.1.3.	<i>DpnI</i> -Verdau.....	12
2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	12
2.2.3.	Gelelution eines PCR-Produktes (Qiagen).....	13
2.2.4.	PCR zur Amplifikation der <i>H. c. samt1</i>	13
2.2.5.	Ligation der <i>samt1</i> in den pET151/D-TOPO Expressionsvektor	13
2.2.6.	Kolonie PCR positiver Klone	13
2.2.7.	Plasmid Minipräparation (Qiagen)	14
2.2.8.	DNA-Konzentrationsbestimmung	14
2.2.9.	Sequenzierung.....	14
2.2.10.	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	15
2.2.11.	Transformation.....	16
2.2.12.	Herstellung von Bakterienkonserven	16
2.2.13.	Überexpression rekombinanter Proteine	16
2.2.13.1	Testung der Expressionsbedingungen für den PET101/D-TOPO-Vektor	17
2.2.13.2.	Testung der Expressionsbedingungen für den pET151/D-TOPO-Vektor	17
2.2.14.	Proteinaufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie	18
2.2.15.	Aufreinigung der SAMT zur Kristallisation.....	19

2.2.16. TEV-Verdau rekombinanter Proteine	20
2.2.17. Gelfiltration	21
2.2.18. Protein-Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD	21
2.2.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.2.20. Coomassiefärbung von Proteingelen	23
2.2.21. Silberfärbung von Proteingelen modifiziert nach Blum (Blum <i>et al.</i> 1987)	23
2.2.22. Western-Blot	25
2.2.22.1 Färbung mit Ponceau S rot	25
2.2.22.2. Immundetektion	26
2.2.23. Funktionsnachweis rekombinanter Proteine mittels GC-MS	27
2.2.24. Radioaktiver Enzymaktivitäts-Test.....	28
2.2.24.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Imidazolkonzentration.....	29
2.2.24.2. Untersuchung der Substratspezifität.....	29
2.2.24.3. Bestimmung enzymkinetischer Parameter	30
2.2.25. <i>In silico</i> -Modellierung der <i>H. c.</i> SAMT	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Mutagenese.....	33
3.2. Sequenzierung.....	36
3.2.1. Wildtypen	36
3.2.2. Mutanten.....	37
3.3. Nachweis der Methylierungsaktivität hergestellter SAMT-Mutanten in der der Bakterienkultur	38
3.4. Überexpression rekombinanter Proteine	45
3.4.1. Testung der Expressionsbedingungen für den pET101/D-TOPO-Vektor und Proteinaufreinigung.....	45
3.5. Optimierung des radioaktiven Enzym-Assays zur Bestimmung der Aktivität rekombinanter Proteine	49
3.5.1. Imidazolkonzentration.....	50
3.5.2. Enzymkonzentration	51
3.6. Substratspektren der <i>H. c.</i> SAMT und ihrer Mutanten.....	52
3.6.1. Substratspektren der Wildtypenzyme SAMT1 und 3	52
3.6.2. Substratspektren der SAMT-Mutanten	55
3.7. Enzymkinetische Parameter	63
3.8. <i>In silico</i> Modellierung der <i>H. c.</i> SAMT	71
3.8.1. Docking von Substraten in das Homologie-Modell der <i>H. c.</i> SAMT	72
3.9. Klonierung und Aufreinigung der SAMT1 zur Kristallisation.....	73
3.9.1. Amplifikation der <i>H. c. samt1</i>	73
3.9.2. Ligation der <i>samt1</i> in den pET151/D-TOPO-Expressionsvektor	73

3.9.3. Testung der Expressionsbedingungen für den pET151/D-TOPO-Vektor und Aufreinigung der rekombinanten SAMT1	75
3.9.4. TEV-Verdau rekombinanter Proteine.....	76
3.9.5. Entfernung des His-Tag und der TEV-Protease.....	77
3.9.6. Reinigung der gespaltenen Proteine mittels Gelchromatografie	78
4. Diskussion	76
4.1. Aktive Zentren von SAMT- und BSMT-Enzymen.....	76
4.2. Charakterisierung der <i>H. c.</i> SAMT	78
4.3. Substrat-Spezifitäten hergestellter SAMT-Mutanten.....	81
4.4. Einfluss weiterer Mutationen	94
4.5. <i>In silico</i> Modellierung der <i>H. c.</i> SAMT	95
4.5.1. Docking von Substraten in das Modell der <i>H. c.</i> SAMT	96
4.6. Kristallisation der <i>Hoya carnos</i> a SAMT	97
7. Anhang	ix
7.1. Nucleotidsequenzen der SAMT1 und 3	ix
7.2. Proteinsequenzen der SAMT1 und 3.....	x
7.3. Coomassie gefärbte Gele affinitätschromatographisch aufgereinigter Proteine	xi
7.4. K_M -Wert Bestimmungen für SA, Lineweaver-Burk-Diagramme	xii
Selbstständigkeitserklärung.....	20
Danksagung.....	21

I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1:** Computermodell des SAMT-Monomers der *C. b.* SAMT
- Abb. 1-2:** Computermodell des aktiven Zentrums der *C. b.* SAMT mit den Substraten SAH und SA.
- Abb. 1-3:** Vergleich der Proteinsequenzen der *H. c.* SAMT1 und der *C. b.* SAMT.
- Abb. 2-1:** Im radioaktiven Enzymtest verwendete Substrate zur Bestimmung des Substratspektrums der *H. c.* SAMT Wildtyp-Enzyme sowie ihrer Mutanten
- Abb. 3-1:** Plasmidkarte des pET101-D/TOPO-*samt1*-Vektors
- Abb. 3-2:** Agarosegele der PCR-Produkte nach der Einführung einzelner Mutationen in die *H. c. samt1* im pET101/D-TOPO-Vektor mittels gerichteter Mutagenese
- Abb. 3-3:** Agarosegele der PCR-Produkte zur Erzeugung der *H. c.* SAMT-Mutanten Met156His und Leu216Met mit schrittweiser Herabsetzung der Annealingtemperatur.
- Abb. 3-4:** Agarosegele der PCR-Produkte von Doppelmutanten aus zuvor hergestellten Einfachmutanten mittels gerichteter Mutagenese
- Abb. 3-5:** Agarosegele der PCR-Produkte von Dreifachmutanten aus zuvor hergestellten Doppelmutanten mittels gerichteter Mutagenese
- Abb. 3-6:** Chromatogramme der Hexanphase ausgeschüttelter BL21(DE3)pSBET-b-Kulturen der überexprimierten SAMT3-Mutante Phe357Tyr .
- Abb. 3-7:** Grafische Darstellung der Peakflächen von MSA und MBA relativ zu Indol (100 %) in Chromatogrammen der GC/MS-analysierten Hexanextrakte von Bakterienkulturen der SAMT3-Mutanten Met156His (**A**) und Val231Ile (**B**) nach Einzelzugabe und simultaner Zugabe von SA und BA.
- Abb. 3-8:** Grafische Darstellung der Peakflächen von MSA und MBA relativ zu Indol (100 %) in Chromatogrammen der GC/MS-analysierten Hexanextrakte von Bakterienkulturen der SAMT1-Mutante Met156His+Leu216Met nach Einzelzugabe und simultaner Zugabe von SA und BA.
- Abb. 3-9:** PAA-Gel der Reinigungsschritte der rekombinanten *H. c.* SAMT3 Val231Phe durch Ni-NTA-Affinitätschromatografie
- Abb. 3-10:** PAA-Gel der löslichen und unlöslichen Protein-Fraktionen nach Optimierung der Überexpression der SAMT1-Mutante Leu216Met+Phe357Thr in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen. Mit Anti-(His)₆-AK erfolgte der Nachweis rekombinanten Proteins (Western Blot).

- Abb.3-11:** Enzymaktivität der *H. c.* SAMT3 mit SA in Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration (n=2)
- Abb. 3-12:** SDS-Gel der SAMT-Elutionsfraktionen (Ni-NTA) mit steigender Imidazolkonzentration (Silberfärbung).
- Abb. 3-13:** Produktbildung (pmol MSA) und Enzymaktivität ($\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) der *H. c.* SAMT3 in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge je Ansatz im radioaktiven Enzymassay (n=1)
- Abb. 3-14:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1 umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-15:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3 umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-16:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Met156His umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-17:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1-Mutante Leu216Met umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-18:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1-Mutante Met156His+Leu216Met umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-19:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Val231Ile umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb 3-20:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Val231Phe umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb 3-21:** Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Phe357Tyr umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet.
- Abb. 3-22:** Vorversuch zur K_M -Wertbestimmung der SAMT3-Mutante Val231Ile: Darstellung der Synthese von MSA (**A**) und MBA (**B**) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Zusatz von 0,05; 0,3 und 0,5 mM SA (**A**) und BA (**B**). n=2

- Abb. 3-23:** Darstellung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile in Abhängigkeit von der SA-Konzentration bei einer Inkubationszeit von 30 min. n=4
- Abb. 3-24:** Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Lineweaver-Burk.
- Abb. 3-25:** Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Eadie-Hofstee.
- Abb. 3-26:** Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Hanes-Wilkinson.
- Abb. 3-27:** Computermodell der AS der aktiven Zentren der *H. c.* und *C. b.* SAMT und der Substrate SAH und SA.
- Abb. 3-28:** Computermodell der AS des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT1 mit den Substraten der *C. b.* SAMT sowie der theoretisch berechneten Ausrichtung der SA nach GOLD.
- Abb. 3-29:** Agarosegel des PCR-Produktes nach Amplifikation des *samt1*-Fragments aus dem pET101/D-TOPO-Vektor (Heidebrecht 2005).
- Abb. 3-30:** Agarosegel der Kolonie-PCR-Produkte nach Ligation der *samt1* in den pET151/D-TOPO-Vektor
- Abb. 3-31:** Plasmidkarte des pET151-D/TOPO-*samt1*-Vektors
- Abb. 3-32:** PAA-Gel der Fraktionen der Aufreinigungen rekombinanter SAMT1 (pET151D-TOPO) überexprimiert in BL21(DE3)pSBET-b (A) und BL21(DE3)pBB540+pBB542 (B).
- Abb. 3-33:** PAA-Gel des TEV-Verdauers der *H. c.* SAMT1 nach 1, 2, 4, 6 und 19 h Inkubation bei 4°C.
- Abb. 3-34:** Von 5 µl TEV-Verdauungs-Ansatz gebildete MSA-Menge vor und nach 2,4 sowie 6 Stunden Inkubation bei 4, 13, 20 und 30°C
- Abb. 3-35:** PAA-Gel der affinitätschromatographischen Aufreinigung rekombinanter SAMT1 nach TEV-Verdau.
- Abb. 3-36:** PAA-Gel des Verdauungs-Ansatzes (V) und der FPLC-Fractionen 21-34 (Silberfärbung) der *H. c.* SAMT1.
- Abb. 4-1:** Relative Aktivitäten ausgewählter SAMT- und BSMT-Enzyme sowie einer NAMT mit 18 getesteten Substraten.
- Abb. 4-2:** Computermodell der an der Bindung von SA beteiligte AS der *H. c.* SAMT.

- Abb. 4-3:** Relative Aktivitäten der SAMT1- und SAMT3-Wildtyp-Enzyme mit den umsetzbaren Substraten, ermittelt im radioaktiven Enzymassay.
- Abb. 4-4:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3.
- Abb. 4-5:** Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT3 (1) und der *H. c.* SAMT3-Mutante Met156His (2), der *N. s.* BSMT1 (4) und der *N. s.* BSMT1-Mutante His158Met (3) mit den 18 getesteten Substraten.
- Abb. 4-6:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT1.
- Abb. 4-7:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT1.
- Abb. 4-8:** Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT1 (1), der *H. c.* SAMT1-Mutanten Leu216Met (2) und Met156His+Leu216Met (3) und der *N. s.* BSMT1 (4) mit den 18 getesteten Substraten.
- Abb. 4-9:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3.
- Abb. 4-10:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3.
- Abb. 4-11:** Computermodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3.
- Abb. 4-12:** Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT3 (1) und der *H. c.* SAMT3-Mutante Phe357Tyr (2) und der *N. s.* BSMT1 (3) mit den 18 getesteten Substraten.

II. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1-1:** An der SA/BA-Bindung beteiligte AS der aktiven Zentren der SAMTs aus *Clarkia breweri*, *Hoya carnosa* und *Stefanotis floribunda* sowie der BSMT/BAMT aus *Nicotiana suaveolens* und *Antirrhinum majus* und die an der *H. c.* SAMT durchgeführten Mutationen.
- Tab. 2-1:** Zusammensetzung von Lysis-, Wasch- und Elutionspufferlösungen zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.
- Tab. 2-2:** Zusammensetzung von Lysis-, Wasch- und Elutionspufferlösungen zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen zur Kristallisation.
- Tab. 2-3:** Zusammensetzung von 10 %igen SDS-PAA-Gelen.
- Tab. 2-4:** Reihenfolge, Dauer und notwendige Lösungen zur Silberfärbung von Proteingelen (Blum *et al.* 1987).
- Tab. 2-5:** Verwendete Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten zur Bestimmung von K_M und v_{max} für SA und BA der *H. c.* SAMT3 und sechs Mutanten der *H. c.* SAMT1 und 3.
- Tab. 3-1:** Variable Positionen innerhalb der AS-Sequenzen der *H. c.* SAMT1, 2 und 3. Abweichende AS sind durch Fettdruck hervorgehoben.
- Tab. 3-2:** AS-Substitutionen der durch Mutagenese erzeugten Einfachmutanten der *H. c.* SAMT1 und 3.
- Tab. 3-3:** Aminosäuresubstitutionen der durch Mutagenese erzeugten Doppel- und Dreifachmutanten der *H. c.* SAMT1 und 3.
- Tab.3-4:** Prozentuale Produktion (Peakfläche) von MSA und MBA im Vergleich zur Indolbildung (100 %) im Kulturüberstand der Wildtyp-SAMT3 und der SAMT1- und SAMT3-Mutanten bei Zugabe von Einzelsubstraten (**SA**, **BA**) und simultaner Zugabe beider Substrate (**SA+BA**)
- Tab. 3-5:** Übersicht über exprimierte SAMT-Enzyme, deren Aktivitäten mit SA und BA in der Bakterienkultur mittels GC/MS nachgewiesen wurden.
- Tab. 3-6:** Expression der rekombinanten Proteine verschiedener Mutanten der *H. c.* SAMT nach Optimierung der Überexpressions-Bedingungen.
- Tab. 3-7:** Übersicht über SAMT-Enzyme, die erfolgreich in BL21(DE3)pSBET-b Zellen exprimiert werden konnten.

- Tab. 3-8:** Zusammenfassung der Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT-Enzyme mit den umsetzbaren Substraten.
- Tab. 3-9:** K_M - und v_{max} -Werte der *H. c.* SAMT-Enzyme mit SA und BA, ermittelt durch lineare Regression nach Lineweaver-Burk sowie daraus abgeleitete Wechselzahlen (k_{cat}) und katalytische Effizienzen (k_{cat}/K_M).
- Tab. 3-10:** Übersicht über SAMT-Enzyme, mit ausreichender Enzymaktivität zur Bestimmung der Substratspektren.
- Tab. 7-1:** Durch unterschiedliche Linearisierungsverfahren ermittelte K_M - und V_{max} -Werte der *H. c.* SAMT-Enzyme mit SA und BA, $n=2$

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAMT	S-Adenosyl-L-Methionin:Benzoessäure-Carboxyl-Methyltransferase
β-ME	β-Mercaptoethanol
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indoylphosphat
bis-Tris	bis (2-Hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)-Methan
bp	Basenpaar(e)
BA	benzoic acid, Benzoessäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]-decan}-4-yl]-1-phenylphosphat
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]-decan}-4-yl]phenylphosphat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat (A/C/G/T)
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5`triphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
3,7-DMXT	3,7-Dimethylxanthin N-methyltransferase
dpm	Anzahl der Zerfälle pro Minute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
h	Stunde
H	Wasserstoff
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
IRD	Ultrarot Färbung (infra red dye)

JMT	S-Adenosyl-L-Methionin:Jasmonsäure Karboxyl Methyltransferase
K _M -Wert	Michaeliskonstante, Kenngröße für eine enzymatische Reaktion
Km	Kanamycin
Kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MBA	Methylbenzoat
min	Minute
ml	Milliliter
MSA	Methylsalizylat
MT	Methyltransferase
7-MXMT	7-Methylxanthin N-Methyltransferase
N	Stickstoff
NBT	Nitrotetrazoliumblau
Ni-NTA	Nickel-Trinitriloessigsäure
O	Sauerstoff
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PC	personal Computer
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PR-1	„pathogenesis related proteins class 1“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RMSD	Root Mean Square Deviation
[S]	Substratkonzentration
S	Schwefel
SA	salicylic acid, Salizylsäure
SABATH	SAMT-BAMT-Theobrominsynthase Familie der Methyltransferasen
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SAMT	S-Adenosyl-L-Methionin:Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferase
SAR	“systemic acquired resistance”
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus (Tabakätzvirus)
TMV	Tabak Mosaik Virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)

UV	ultraviolett
V	Volt; Reaktionsgeschwindigkeit
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, Kenngröße für eine enzymatische Reaktion
v/v	Volumen je Volumen
VOC	volatile organic compound (flüchtige organische Verbindungen)
w/v	Masse je Volumen
x	mal
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen Aminosäuren

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

1. Einleitung

1.1. Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt

Die Pflanze ist aufgrund ihrer örtlich gebundenen Lebensweise auf Signale angewiesen, die ihr die Kommunikation mit ihrer Umwelt erlauben. So nutzt die Pflanze für die Bestäubung von Blüten und zur Verbreitung von Früchten optische sowie chemische Signale (Pichersky & Gang 2000). Letztere können auch über weite Distanzen ihre Wirkung entfalten und Bestäuber sowie Früchte verbreitende Tiere zur Pflanze leiten. Flüchtige organische Verbindungen (auch VOCs für volatile organic compounds) werden aber auch von den Blättern und den Wurzeln emittiert und dienen der Pflanze zur Etablierung symbiotischer Verbindungen mit Mikroorganismen und schützen vor Pathogenen und Herbivoren, aber auch vor pflanzlichen Konkurrenten (Pichersky & Gang 2000, D'Auria *et al.* 2002, Wenke *et al.* 2010). Insgesamt sind Pflanzen in der Lage mehr als 1700 flüchtige Verbindungen, die dem Sekundärmetabolismus entstammen, zu bilden (Knudsen *et al.* 2006). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um lipophile Moleküle mit einem hohen Dampfdruck. Während der Synthese kann es zu verschiedenen Modifikationen wie beispielsweise der Entfernung hydrophiler Reste, Acetylierung oder Methylierung kommen (Pichersky *et al.* 2006). Die Methylierung von Metaboliten ist eine der häufigsten enzymatischen Modifikationen im pflanzlichen Organismus. Der Transfer einer Methylgruppe findet auf eine Vielzahl von Stoffgruppen statt und erfolgt auf Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- oder Sauerstoffatome von Aminosäuren, Alkaloiden, Phenylpropanoiden, Zuckern, Purinen, Sterolen, Thiolen und Flavonoiden (D'Auria *et al.* 2002). Modifikationen an Sekundärmetaboliten verändern nicht nur ihre Eigenschaften wie Flüchtigkeit, Membranpermeabilität, Stabilität und Aktivität, sondern erlauben ebenso eine exakte räumliche und zeitliche Kontrolle der Aktivierung einer Funktion (Wildermuth 2006).

1.1.1. Bedeutung von Benzoessäure und ihren Derivaten

Eine wichtige Gruppe durch Methylierung aktivierter Substanzen bilden die Benzoessäurederivate, welche dem Phenylpropanoidstoffwechsel entstammen (Vogt 2010). Sie sind weit verbreitete Vermittler der pflanzlichen Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress (Gang 2005). Neben der Jasmonsäure und Methyljasmonat ist hierbei auch die Wirkung von Salizylsäure (SA, engl. salicylic acid) sowie des flüchtigen Methylsalizylats (MSA) gut untersucht (Seo *et al.* 2001, Beckers & Spoel 2005, Wasternack 2007). Bei Pathogenbefall führt die Akkumulation von SA zur Ausbildung einer lokalen sowie systemischen Resistenz (SAR, engl. systemic acquired resistance) (Ribnicky *et al.* 1998, Vallad & Robert 2004,

Wildermuth 2006, Park *et al.* 2007). MSA dient als flüchtiges Signal, welches bei der Beschädigung durch Herbivore vom Blatt emittiert wird. Das Signal kann zum einen in entfernten Blättern oder Pflanzen eine Resistenz hervorrufen und zum anderen Fressfeinde oder Parasiten der Herbivoren anlocken (Shulaev *et al.* 1997, James 2003, Kappers *et al.* 2011). Auch wird die Anfälligkeit der Pflanze für Pathogene wie Bakterien und Pilze beeinflusst (Halim *et al.* 2007, Kniskern *et al.* 2007, Arimura *et al.* 2009). In verschiedenen Experimenten konnte eine Behandlung mit MSA den Befall durch Herbivore vermindern. So wurden MSA-Köder erfolgreich in Sojafeldern zur Reduktion der Soja-Blattlaus durch die Anlockung räuberischer Flor- und Schwebfliegen eingesetzt (Mallinger *et al.* 2011). In einem ähnlichen Versuch lockte MSA verschiedene Raubinsekten in Trauben- und Hopfenkulturen an (James & Price 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch nachgewiesen werden, dass versprühtes MSA die Kohleule (*Mamestra brassicae*) davon abhält, ihre Eier auf *Brassica napus* abzusetzen. Das bei Raupen-Fraß emittierte MSA signalisierte dem Falter, dass die Pflanze bereits besetzt ist (Ulland *et al.* 2008). Eine allelopathische Wirkung konnte für das Methylbenzoat (MBA, BA engl. für benzoic acid) nachgewiesen werden, welches sich hemmend auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* auswirkte und im Duft der Katzenminze zur Hemmung des Wachstums von Kresse-Keimlingen beiträgt (Eom *et al.* 2006, Horiuchi *et al.* 2007).

MSA und MBA sind ebenso Bestandteile floraler Düfte, wobei sie nachweislich das Verhalten von Bestäubern beeinflussen. Dies wurde elektroantennographisch an den bestäubenden Insekten, so zum Beispiel den Schwärmern *Hyles lineata* und *Sphinx perelegans* untersucht (Raguso *et al.* 1996, Raguso & Light 1998). Diese Schwärmer bestäuben die einjährige *Clarkia breweri* (*Onagraceae*) und reagieren auf MSA im Blütenduft. Der Tabakschwärmer (*Manduca sexta*) reagiert auf die MBA-Emission von *Petunia axillaris* (Honda & Ômura 1998, Raguso & Light 1998, Hoballah *et al.* 2005). Ebenso sind MSA und MBA Bestandteile des Duftes von Früchten wie der Tomate und der Bitterorange (*Citrus aurantium*) bzw. der Ananasguave (*Feihoa sellowiana*) (Binder & Flath 1989, Rasgado *et al.* 2009, Tieman *et al.* 2010). MBA ist auch ein Aromastoff im Rotwein und wird als blumig und honigartig beschrieben (Ferreira *et al.* 2001). Neben den Früchten sind die Methylester von SA und BA auch im Nektar von Blüten nachweisbar (Kessler & Baldwin 2007).

1.2. Methyltransferasen der SABATH Gruppe

Die Enzyme zur Methylierung von SA und A gehören zu einer Klasse von Methyltransferasen, welche erstmals von Ross *et al.* 1999 beschrieben wurde. Mit der *Clarkia breweri* (*C. b.*) S-

Adenosyl-Methionin:Salizylsäure Carboxyl-Methyltransferase (SAMT) wurde das erste Mitglied der SABATH-Methyltransferasen isoliert und charakterisiert. Die Namensgebung erfolgte nach der *C. b.* **S**AMT (Ross *et al.* 1999), der **B**AMT aus *Antirrhinum majus* (Murfitt *et al.* 2000) und der **T**heobrominsynthase aus *Camellia sinensis* (Kato *et al.* 1999). Die Enzyme dieser Gruppe weisen eine große Sequenzähnlichkeit auf und unterscheiden sich von allen anderen bekannten Methyltransferasen (MTs). Neben den namengebenden MTs konnten bis heute zahlreiche Mitglieder der SABATH-MTs identifiziert werden. Dazu gehören die Benzoessäure/Salizylsäure-MT (BSMT) (Pott *et al.* 2004), die Anthranilsäure-MT (AAMT, engl. anthranilic acid methyltransferase) (Köllner *et al.* 2010), die Nicotinsäure-MT (NAMT, engl. nicotinic acid methyltransferase) (Hippauf *et al.* 2010), die Jasmonsäure-MT (JMT) (Seo *et al.* 2001), die Zimtsäure/p-Cumarsäure-MT (CCMT, eng. cinnamate/p-coumarate methyltransferase) (Kapteyn *et al.* 2007), die Farnesensäure-MT (FAMT, engl. farnesoic acid methyltransferase) (Yang *et al.* 2006), die Indol-3-Essigsäure-Methyltransferase (IAMT, engl. indole-3-acetic acid methyltransferase) (Zhao *et al.* 2007), die Logansäure-Methyltransferase (LAMT, engl. loganic acid methyltransferase) (Murata *et al.* 2008) und die Coffeinsynthase (CTS) (Mizuno *et al.* 2003). Obwohl die Enzyme der SABATH-Familie chemisch sehr unterschiedliche Strukturen methylieren, handelt es sich um homologe Proteine mit ähnlicher Struktur (Noel *et al.* 2003). So sind die Enzyme aus 357-389 Aminosäuren (AS) aufgebaut, woraus sich eine Molekülmasse von 40-49 kDa ergibt. Das Holoenzym ist aus 2 identischen Untereinheiten zusammengesetzt, welche *in vivo* cytosolisch lokalisiert sind (D'Auria *et al.* 2003). Die Mitglieder der SABATH-MTs besitzen eine AS-Identität von 40-45 %, wobei die SAMT-Enzyme mit mindestens 55 % Identität eine besonders große Ähnlichkeit aufweisen (D'Auria *et al.* 2003). Die für die Substratbindung entscheidenden Regionen sowie die dreidimensionale Struktur der Proteine sind hoch konserviert. So handelt es sich bei dem Monomer um eine globuläre Struktur mit einer Anordnung von beta-Faltblättern, welche eine Rossmann-Faltung aufweisen (Abb. 1-1, gelb). N-terminal besitzt das Protein eine alpha-helikale Kappe, welche die aktive Tasche bedeckt (Noel *et al.* 2003). Die Abbildung 1-1 zeigt die dreidimensionale Struktur einer Untereinheit der *C. b.* SAMT mit den gebundenen Molekülen S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) und SA, die mittels Kristallisation aufgeklärt wurde (Zubieta *et al.* 2003).

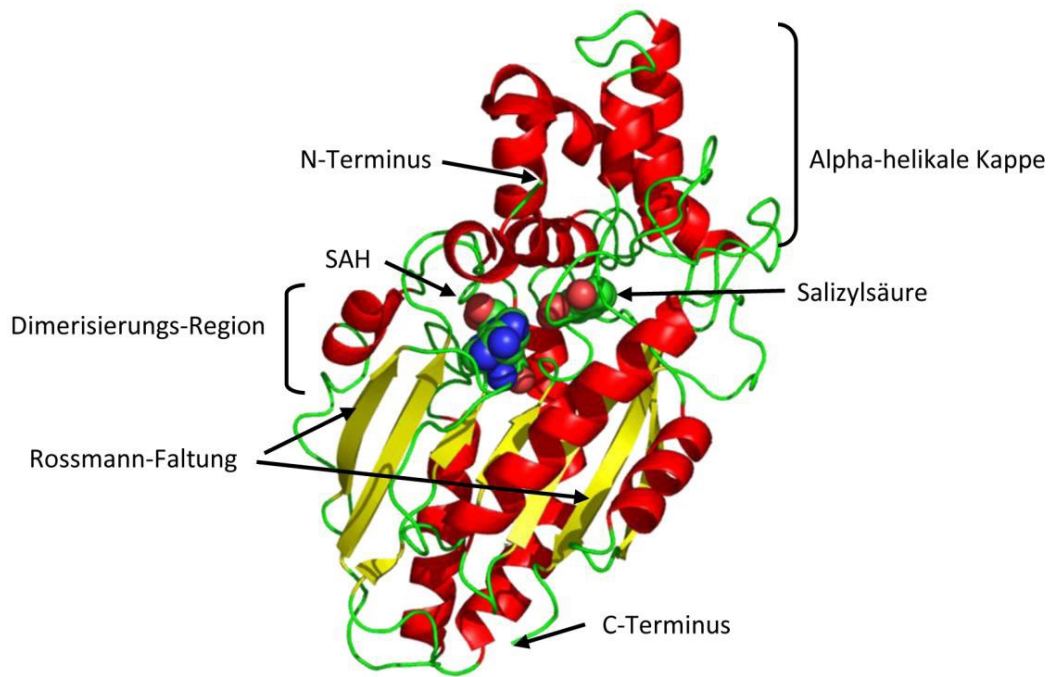


Abb. 1-1: Computermodell des SAMT-Monomers der *C. b. SAMT* (NCBI: 1M6E, Wang *et al.* 2007) mit den Substraten SAH und SA, die in Sphären dargestellt sind (C grün, O rot, N blau). Das Enzym-Modell ist nach Sekundärstrukturen gefärbt: α -Helices rot, β -Faltblätter gelb, Loops grün.

Diese Methode ermöglichte ebenfalls die Identifizierung der an der Substratbindung beteiligten AS. Dabei zeigte sich, dass zu der Bindung des SAM sieben AS beitragen und an der Bindung von Salizylsäure 11 AS beteiligt sind (Zubieta *et al.* 2003, Efmert *et al.* 2005). Bereits durch Fauman *et al.* 1999 wurde das Bindungsmuster des Methylgruppendonors in SAM-abhängigen MTs identifiziert. Dabei treten definierte Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem SAM und den AS der SAM-Bindestelle auf. Diese konnten auch in der *C. b. SAMT* nachgewiesen werden. Das SAH wird durch Wasserstoff-Brücken im aktiven Zentrum fixiert. In der Kristallstruktur bildet Asp98 Wasserstoff-Brücken mit beiden Hydroxylgruppen der Ribose des SAH (Abb. 1-2). Eine weitere Brücke wird zwischen der Amidgruppe von Asn65 und dem Carboxylende des SAH ausgebildet. Zusätzlich bildet die exocyclische Aminogruppe des Adeninrings eine Brücke zur Hydroxylgruppe von Ser129 aus. Neben diesen Bindungen wird das SAH ebenfalls durch van der Waals-Wechselwirkungen in der Tasche stabilisiert. Der Adeninring des SAH interagiert durch π - π -Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring von Phe130, während Leu99 am Adeninring von der anderen Seite an der Bildung einer Molekülklammer beteiligt ist (Zubieta *et al.* 2003).

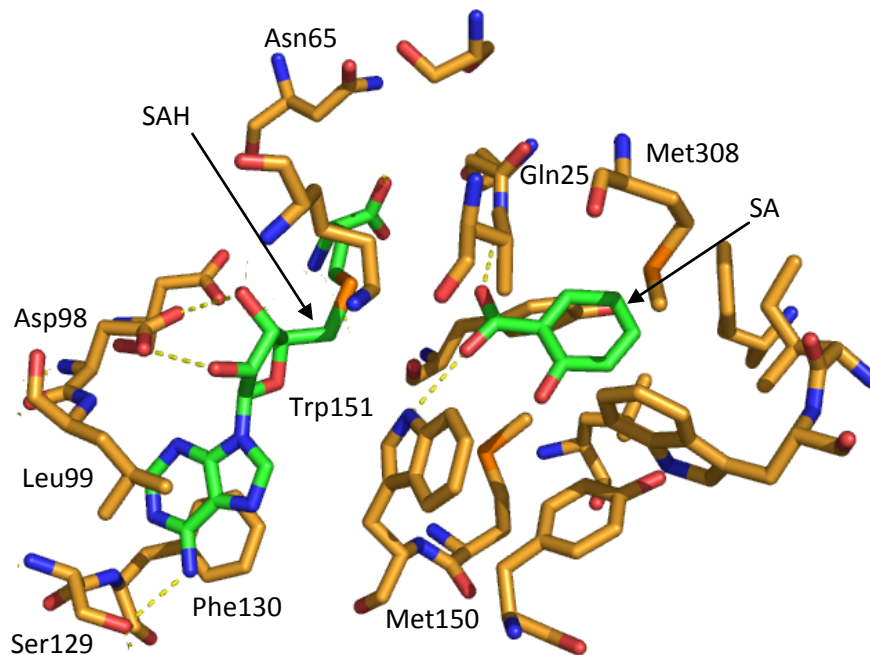


Abb. 1-2: Computermodell des aktiven Zentrums der *C. b.* SAMT mit den Substraten SAH und SA (grün). Die für die Substratbindung wichtigen AS sind markiert (NCBI: 1M6E, Wang *et al.* 2007). Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

Auch die Bindung der SA wird durch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoff-Brücken stabilisiert. So bilden die Thioether-Gruppen von Met150 und Met308 eine Molekülklammer aus, die den Benzenring der SA fixieren (Abb. 1-2). Weiterhin wird die Carboxylgruppe durch zwei Wasserstoffbrücken im 3Å-Abstand zur Methylgruppe positioniert, welche vom Indol-Stickstoff des Trp151 und vom Amid-Stickstoff des Gln25 ausgehen. Alle weiteren an der Substratbindung beteiligten AS bilden eine hydrophobe Tasche, welche die sterisch korrekte Ausrichtung des Substrates zum Methylgruppendonator fördert. Die aktive Tasche liefert die Bindungsenergie für die Entfernung der Wasserhülle um das reaktive Oxy-Anion der SA. Die funktionelle Gruppe liegt bei physiologischem pH deprotoniert vor. Die Transmethylierung findet ohne Säure/Basen-Katalyse statt (Zubieta *et al.* 2003).

1.3. Ziel der Arbeit

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der *C. b.* SAMT diene als Grundlage für die Untersuchung der aktiven Zentren weiterer SABATH-Methyltransferasen. Innerhalb der SABATH-Methyltransferasen bilden die SAMT- und BSMT-Enzyme eine phylogenetische Einheit, die sich deutlich von allen anderen Mitgliedern dieser Gruppe abgrenzen (Hippauf *et al.* 2010). Obwohl die meisten SAMT/BSMT-Enzyme SA sowie auch BA methylieren können, sind sie in der Lage diese Substrate zu unterscheiden und nur eines mit hoher Aktivität

dem Ziel durchgeführt, die Spezifität für BA zu erhöhen (Tab.1-1, rot). Um den Einfluss auf die Größe des Substratspektrums zu untersuchen, wurden die AS Leu216 und Trp232 in Richtung Multisubstratenzym mutiert (Tab.1-1, grün). Die Aminosäuresubstitutionen sollten einen Einblick in die Bedeutung einzelner AS des aktiven Zentrums für die Substratspezifität und Selektivität sowie die Größe des Substratspektrums geben.

Tab. 1-1: An der SA/BA-Bindung beteiligte AS der aktiven Zentren der SAMTs aus *Clarkia breweri*, *Hoya carnosa* und *Stefanotis floribunda* sowie der BSMT/BAMT aus *Nicotiana suaveolens* und *Antirrhinum majus* und die an der *H. c.* SAMT durchgeführten Mutationen (rot: zur Erhöhung der Spezifität für BA, grün: zur Vergrößerung des Substratspektrums).

Multisubstratenzyme

<i>C.b.</i> SAMT	<i>H.c.</i> SAMT	<i>S.f.</i> SAMT	<i>N.s.</i> BSMT	<i>A.m.</i> BAMT	Mutanten der <i>Hoya</i> SAMT
Gln	Gln 25	Gln	Gln	Gln	
Tyr	Tyr 153	Tyr	Phe	Tyr	
Met	Met 156	Met	His	His	Met156His
Trp	Trp 157	Trp	Trp	Trp	
Leu	Leu 216	Met	Met	Asn	Leu216Met
Ile	Val 231	Ala	Ile	Ile	Val231Ile, Val231Phe
Trp	Trp 232	Leu	Leu	Phe	Trp232Leu
Tyr	Tyr 261	Tyr	Tyr	Tyr	
Met	Met 318	Val	Met	Val	
Val	Val 321	Val	Phe	Ile	Val321Phe, Val321Tyr
Phe	Phe 357	Phe	Ser	Tyr	Phe357Ser, Phe357Thr, Phe357Tyr

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. *Escherichia coli* Bakterienstämme mit Genotyp

XL1 blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) (STRATAGENE)
BL21 Star TM (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131 λ(DE3)</i> (Invitrogen)
HMS174 (DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR(rK12- mK12+)</i> (DE3) (Rif R)
BL21 (DE3) pSBET-b	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) argU Km^r</i> (STRATAGENE)
BL21 (DE3) pBB540	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
+pBB542	

2.1.2. Plasmide

pET101/D-TOPO	Vektor zur IPTG-induzierten Proteinexpression mit C-terminaler (His) ₆ -Fusion (Invitrogen 2002), Ampicillin-Resistenz, T7 Promotor, Lac Operator, RBS, V5 Epitop, Polyhistidin (6 x His) Region, TOPO [®] Klonierungsregion, bla Promotor, ROP ORF, lacI ORF
pET151/D-TOPO	Vektor zur IPTG-induzierten Proteinexpression mit N-terminaler (His) ₆ -Fusion und TEV-Schnittstelle (Invitrogen, 2002), Ampicillin-Resistenz, T7 Promotor, Lac Operator, RBS, Initiation ATG, Polyhistidin Region, V5 Epitope, TEV Erkennungsstelle, lacZ ORF, ROP ORF, lacI ORF
pSBET-b	Vektor zur IPTG-induzierten Expression von Proteinen mit <i>argU</i> Gen (Schenk <i>et al.</i> 1995)
pBB540	Vektor zur IPTG-induzierten Expression von GrpE und ClpB Chaperonen, PA1/ <i>lacO1</i> Promotor, pSC101 origin, Resistenzen gegen Chloramphenicol, 3-5 Kopien je Zelle (de Marco 2007)
pBB542	Vektor zur IPTG-induzierten Expression von KJE (DnaK mit seinen Cochaperonen DnaJ und GrpE) und grossen Mengen von ELS (GroEL mit seinen GroES Cochaperonen), PA1/ <i>lacO1</i> Promotor, Resistenz gegen Spectinomycin, ~ 30 Kopien je Zelle (de Marco 2007).

2.1.3. Oligonukleotidprimer

Genspezifische sowie vektorspezifische Primer wurden von Invitrogen (Live Technologies GmbH, Darmstadt) bezogen.

Genspezifische Primer

HcSTARTDR	5'-ATGGAAGTTGTTGATTTCTTC-3'
Hc_int_DR	5'-GTCGAGCAGAGGAATTG-3'
HcSAMT_reverse	5'-CTAAACCCTTCTGGTCATGGAG-3'
HcSAMT_Start2	5'-CACCATGGAAGTTGTTGATGTTTC-3'

Mutageneseprimer

HcM156Hf	5'-CAC TCA TCC TAT AGT GTC CAC TGG CTT TCT CGG GTC CC-3'
HcM156Hr	5'-GGG ACC CGA GAA AGC CAG TGG ACA CTA TAG GAT GAG TG-3'
HcL216Mf	5'-GGC GGG GTT ATG GTG TTA ACA TTT ATG GGG AGA AAA AGT GAA G-3'
HcL216Mr	5'-CTT CAC TTT TTC TCC CCA TAA ATG TTA ACA CCA TAA CCC CGC C-3'
HcV231Ff	5'-GGA GAG TGG CTA TTT TTG GGA GCT TTT AGC TAG GGC C-3'
HcV231Fr	5'-GGC CCT AGC TAA AAG CTC CCA AAA ATA GCC ACT CTC C-3'
HcV231lf	5'-GGA GAG TGG CTA TAT CTG GGA GCT TTT AGC TAG GGC-3'
HcV231lr	5'-GCC CTA GCT AAA AGC TCC CAG ATA TAG CCA CTC TCC-3'
HcW232Lf	5'-GAG AGT GGC TAT GTG TTG GAG CTT TTA GCT AGG G-3'
HcW232Lr	5'-CCC TAG CTA AAA GCT CCA ACA CAT AGC CAC TCT C-3'
HcV321Ff	5'-CGA ATT GCA TGA GAG CCT TCG CGG AAC CCT TGC TG-3'
HcV321Fr	5'-CAG CAA GGG TTC CGC GAA GGC TCT CAT GCA ATT CG-3'
HcV321Yf	5'-CGA ATT GCA TGA GAG CCT ACG CGG AAC CCT TGC TG-3'
HcV321Yr	5'-CAG CAA GGG TTC CGC GTA GGC TCT CAT GCA ATT CG-3'
HcF357Tf	5'-CCAAAGAGAAGACTGAGACCATCAATG TCA CCG TCT C-3'
HcF357Tr	5'-GAG ACG GTG ACA TTG ATG GTC TCA GTC TTC TCT TTG G-3'
HcF357Sf	5'-CCA AAG AGA AGA CTG AGT CCA TCA ATG TCA CCG TC-3'
HcF357Sr	5'-GAC GGT GAC ATT GAT GGA CTC AGT CTT CTC TTT GG-3'
HcF357Yf	5'-CCA AAG AGA AGA CTG AGT ACA TCA ATG TCA CCG TCT CC-3'
HcF357Yr	5'-GAC GGT GAC ATT GAT GTA CTC AGT CTT CTC TTT GG-3'

5' IRD 800 markierte Primer für die Sequenzierung

T7_Term_IRD	5'-CCT CAA GAC CCG TTT AGA-3'
T7_Prom_IRD	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
Hc_SAMT_int	5'-GTC GAG CAG AGG AAT TG-3'
Hc_CAC_Start	5'-CAC CAT GGA AGT TGT TGA TGT TC-3'

2.1.4. Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien vom Reinheitsgrad p. A. wurden von den Firmen Roth, Sigma, Fluka, ROCHE, Promega, Finnzymes und Merck bezogen. Alle Lösungen wurden mit doppelt

destilliertem Wasser oder unvergälltem Alkohol von 97 % angesetzt und bei Bedarf autoklaviert oder mit einem Sterilfilter (Porengrösse 0,45 µl) filtriert.

Für radioaktive Tests wurde ^{14}C -SAM von der Firma Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig) bezogen, als Szintillationsflüssigkeit diente Emulsifier SafeTM von Perkin Elmer.

Enzyme

Polymerase:	<i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase (STRATAGENE) Platinum [®] <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (Invitrogen) <i>Taq</i> -Polymerase
Restriktionsendonuklease :	<i>DpnI</i> (Fermentas) TEV-Protease (Invitrogen)
Verdauungsenzym:	Lysozym (Fluka)

Kits

QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen)
QIAprep[®] Miniprep Kit (Qiagen)
Champion pET Directional TOPO Expressions Kit (Invitrogen)
SequiTherm EXEL II DNA Sequencing Kit-LC (Biozym)

2.2. Methoden

2.2.1. Mutagenese nach STRATAGENE

Zum gezielten Austausch einzelner AS in der *H. c. samt1*-Sequenz wurde die PCR-basierte Mutagenese nach STRATAGENE angewandt. Die Durchführung erfolgte laut der Anleitung zum QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit. Die Methode ermöglichte eine spezifische Mutation in nahezu jedem doppelsträngigen Plasmid mit einer Effektivität von 80 % (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA).

Für eine Mutagenese wurde ein doppelsträngiger DNA-Vektor und zwei synthetische Oligonukleotid-Primer benötigt. Diese Primer enthielten den gewünschten Nukleotidaustausch und waren jeweils zu einem Vektor-Strang komplementär. Während der PCR wurden die Primer durch die *Pfu Turbo* DNA Polymerase verlängert. So entstanden mutierte Plasmide mit versetzten Brüchen (staggered nicks).

Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze mit *DpnI* verdaut. Diese Endonuklease baute selektiv methylierte und hemimethylierte DNA ab und entfernte somit die nicht mutierte

Ursprungs-DNA. Die neu synthetisierte und wahrscheinlich mutierte DNA lag unmethyliert vor und wurde nicht abgebaut. Sie wurde im Anschluss in superkompetente XL-1-Blue-Zellen transformiert.

2.2.1.1. Generierung von Mutagenese-Primern

Je nach der gewünschten Mutation wurden die Mutagenese-Primer individuell hergestellt. Sie mussten verschiedene Voraussetzungen erfüllen. So sollten beide Primer die Mutation enthalten und die gleiche Sequenz an gegenüberliegenden DNA-Strängen binden. Idealerweise hatten die Primer eine Länge von 25-45 Basen und eine Schmelztemperatur (T_m) von $\geq 78^\circ\text{C}$. Die Schmelztemperatur konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch} \quad \begin{array}{l} (N = \text{Primerlänge in Basen} \\ \text{mismatch} = \text{Zahl ausgetauschter Basen}) \end{array}$$


Die Primer sollten einen GC-Gehalt von mindestens 40 % enthalten und mit einem C oder G enden.

2.2.1.2. PCR zur Mutagenese

Zur Mutagenese wurden die PCR-Ansätze wie folgt hergestellt. Eine wichtige Voraussetzung war ein Überschuss an den entsprechenden Primern.

7,5 μl	10 x Reaktionspuffer (Endkonz. 1,5 x)
7 μl	Primer fwd. (~ 200 ng)
7 μl	Primer rev. (~ 200 ng)
1 μl	Plasmid (~ 50 ng)
2 μl	dNTP-Mix (ROCHE, 10 mM je dNTP)
<u>25,5 μl</u>	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
Σ 50 μl	Reaktionsansatz
+ 1 μl	<i>Pfu</i> Turbo Polymerase

Die Amplifikation der Plasmide erfolgte im Thermocycler (BIOMETRA) unter folgenden Bedingungen:

2 min	95°C		16 x
30 s	95°C		
1 min	55°C		
14 min	68°C		
10 min	68°C		

∞ min 10°C

Um eine vollständige Amplifikation des Plasmids zu gewährleisten, war eine Elongationszeit von 2 Minuten je kb notwendig. Bei einer Plasmidlänge von 7 kb hatte dieser Schritt somit eine Länge von 14 Minuten. Konnte nach der PCR im Agarose-Gel kein Produkt nachgewiesen werden, war es möglich durch eine schrittweise Herabsetzung der Annealingtemperatur um je 0,5-1°C eine Produktbildung zu erreichen. Mit der Herabsetzung der Annealingtemperatur sank gleichzeitig die Stringenz und eine unspezifische Primerbindung wurde möglich, sodass auch unerwünschte Produkte auftauchen konnten.

2.2.1.3. *DpnI*-Verdau

Das zur Mutagenese verwendete Plasmid wurde aus *E. coli* isoliert und wies somit eine dam-Methylierung auf. So war es möglich die parentale und nicht mutierte DNA mit Hilfe der Endonuklease *DpnI* abzubauen. Dazu wurde zum PCR-Ansatz 1 µl *DpnI* (10 U/µl) gegeben, durch auf- und abpipettieren gemischt und 1 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C.

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Erstarren des Agarose-Gels wurden 15 µl PCR-Produkt mit 6 µl Roti® Load versetzt je Spur aufgetragen und für 40-60 min bei konstant 70 V aufgetrennt. Dabei diente 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer. Als Größenstandard wurden 5 µl *PstI*-verdaute DNA des λ-Phagen aufgetragen.

50 x TAE-Puffer:	2 M	Tris-HCl
	1 M	Eisessig
	0,5 M	Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O
	pH 8,0, autoklavieren	

Zur Elution bestimmter Banden aus dem DNA-Gel wurde anschließend ein 1,8 %-iges (w/v) Agarosegel verwendet, welches einer Elektrophorese von 15 min bei 30 V und anschließenden 40 min bei 70 V unterzogen wurde. Die höhere Agarosekonzentration und die längere Laufzeit ermöglichten eine bessere Auftrennung vorhandener DNA-Banden.

2.2.3. Gelelution eines PCR-Produktes (Qiagen)

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte nach Anleitung mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen.

2.2.4. PCR zur Amplifikation der *H. c. samt1*

Zur Amplifikation des *samt1*-Fragments wurde der von Heidebrecht 2005 hergestellte Expressionsvektor verwendet. Hierbei handelte es sich um den pET101/D-TOPO-Vektor von Invitrogen. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das Reaktionsprogramm entsprachen der Vorgehensweise von Heidebrecht (2005). Zur Überprüfung des Erfolges der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese angeschlossen. Das entstandene Fragment wurde aus dem Gel eluiert und zur Ligation verwendet.

2.2.5. Ligation der *samt1* in den pET151/D-TOPO Expressionsvektor

Das *samt1*-Fragment wurde nun in den pET151/D-TOPO Expressionsvektor ligiert. Dabei fand das Champion pET Directional TOPO Expressions Kit von Invitrogen Verwendung. Hierbei erfolgte eine gerichtete Klonierung durch einen GTGG-Überhang am 3'-Ende des Klonierungs-Vektors. Der Klonierungsansatz besaß folgende Zusammensetzung:

4 µl	PCR-Produkt (<i>H. c. samt1</i>)
1 µl	Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)
1 µl	pET151/D-TOPO-Vektor

Die Ligation des PCR-Fragments in den Expressionsvektor erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT). 3 µl des Ansatzes wurden anschließend zur Chemotransformation von 50 µl TOP-10-Zellen verwendet. Die Durchführung der Transformation erfolgte wie im Abschnitt 2.2.11. beschrieben. Positive Klone wurden über Nacht auf LB-Amp¹⁰⁰-Platten selektiv angezogen.

2.2.6. Kolonie PCR positiver Klone

Zur Überprüfung der gelungenen Ligation in den Expressionsvektor wurde eine Kolonie-PCR der selektierten Klone durchgeführt. Der entsprechende PCR-Ansatz war folgender Maßen zusammengesetzt:

2,5 µl	10 x PCR-Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTP-Mix (10 mM je dNTP)
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	T7-Promotor (10 pmol/µl)

	0,5 µl	T7-Terminator (10 pmol/µl)
	1 µl	Taq-Polymerase
	<u>19,25 µl</u>	H ₂ O _{bidest}
Σ	25 µl	Reaktionsansatz

Nun wurde von jeder zu analysierenden *E. coli*-Kolonie eine Probe mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in den vorbereiteten 25 µl-Reaktionsansatz gegeben, die Komponenten gemischt und einer PCR unterzogen. Für spätere Experimente wurden die Klone zusätzlich auf eine Masterplatte mit LB-Amp¹⁰⁰-Medium gebracht.

Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Konnte ein Fragment amplifiziert werden, wurde die korrekte Ausrichtung und Richtigkeit des Fragments durch Sequenzierung überprüft.

2.2.7. Plasmid Minipräparation (Qiagen)

Die Plasmid-Minipräparation erfolgte nach Vorschrift mit dem QIAprep® Miniprep Kit von Qiagen.

2.2.8. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruhte auf deren Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Bestimmung der Absorption erfolgte photometrisch in Quarzküvetten, da diese UV-Licht nicht absorbieren. Eine Lösung mit 50 µg/ml doppelsträngiger DNA besitzt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Diese optische Dichte diente der Bestimmung der Konzentration einer unbekannten DNA-Lösung. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA durch Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt, da es sich dabei um das Absorptionsmaximum von Proteinen handelt.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden je zwei Verdünnungen hergestellt, bei denen 1 und 2 µl DNA-Lösung in je 200 µl H₂O_{bidest} verdünnt wurden. Die Ansätze wurden gemischt und in Quarzküvetten überführt. Im Smart SpecTM3000 (BIO RAD) wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

2.2.9. Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenz klonierter oder mutierter DNA-Fragmente war es notwendig, das jeweilige Plasmid auf die korrekte Insertion oder Mutation und auf eine fehlerfreie Amplifikation zu überprüfen. Dazu wurde eine Sequenzierung nach der Sanger-Methode durchgeführt. Die Methode basierte auf der enzymatisch katalysierten Synthese von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die gelelektrophoretisch nach ihrer Größe

aufgetrennt werden konnten. Aus dem entstehenden Bandenmuster im denaturierenden Polyacrylamidgel wurde die Sequenz rekonstruiert (Lottspeich & Zorbas 1998).

Die Sequenzierung erfolgte nach Vorschrift mittels des SequiTherm EXEL II DNA Sequencing Kit-LC (Biozym). Die Auftrennung und Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgte am LI-COR DNA-Analyzer GENE READER 4200 (MWG-BIOTECH).

2.2.10. Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Bakterienanzucht wurden zunächst geeignete Bakterien ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Mit einer Kolonie wurden 4 ml Ψ -Medium beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 100 μ l in 10 ml vorgewärmtes Ψ -Medium gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 200 rpm bis eine Zelldichte entsprechend einer OD₆₀₀ von 0,3 erreicht wurde (nach ca. 3 h). Mit dieser Kultur wurden nun 100 ml Ψ -Medium beimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 wurden 5 ml Kultur eingesetzt. Lag die OD₆₀₀ nicht genau 0,3 wurde das zuzusetzende Volumen wie folgt berechnet: zuzusetzendes Volumen = (5 ml*0,3)/vorhandene OD₆₀₀. Die 100 ml Ψ -Medium wurden anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (nach ca. 4 h) inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation in 50 ml Falcons bei 4000 x g und 4°C für 10 min. Die pelletierten Zellen wurden in je 15 ml TFB I-Medium resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Bei einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g und 4°C wurden die Zellen nochmals pelletiert, in je 2 ml TFB II-Medium aufgenommen und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 μ l aliquotiert und bei -70°C gelagert. Eine Kontrolle der Kompetenz erfolgte durch Transformation mit 1, 0,1 und 0,01 μ g Plasmid.

TFB I-Medium:	15 % (v/v)	Glycerin
	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MnCl ₂ -Dihydrat
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂ -Dihydrat
pH 5,8 einstellen, steril filtrieren, bei -20°C lagern		

TFB II-Medium:	15 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂ -Dihydrat
	10 mM	RbCl
pH 7,0 einstellen, steril filtrieren, 2 ml Aliquots herstellen, bei -20°C lagern		

Ψ -Medium:	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Trypton

	0,4 % (w/v)	MgSO ₄ -Heptahydrat
	10 mM	KCl
	pH 7,6 einstellen, autoklavieren	
SOC-Medium:	2 % (w/v)	Bacto Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	pH 7 einstellen und autoklavieren	
	20 mM	Glucose (50 % Glucose-Stammlösung, steril filtriert)
	10 mM	MgCl ₂ (1 M Stammlösung steril filtriert)

2.2.11. Transformation

Zur Transformation wurden die Aliquots mit chemokompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid zu je 50 µl Zellen gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 min wurden 500 µl SOC-Medium zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden ca. 150 µl auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Selektierte Klone wurden auf eine Masterplatte gebracht und nummeriert. Sie dienten zur Herstellung von Bakterienkonserven und zur Plasmid-Minipräparation.

2.2.12. Herstellung von Bakterienkonserven

In 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden 700 µl LB-Medium gegeben und vom gewünschten Klon eine Kolonie mit einer sterilen Impföse eingebracht. Die *E. coli*-Kultur wurde dann über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Konservierung erfolgte anschließend die Zugabe von 300 µl 50 %-igem sterilen Glycerin. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.13. Überexpression rekombinanter Proteine

Der entsprechende Expressionsvektor wurde in BL21 (DE3) chemokompetente Zellen mit dem pSBET-b Helferplasmid transformiert. In diesem Expressionssystem erfolgte der Start der Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG. Dieses Laktose-Derivat bindet den lac-Operator, der einer Glukose-Repression unterliegt. Daher sollte das Medium keine Glukose enthalten. Die Transformation erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.11. beschrieben. Zur Herstellung der Vorkultur wurde eine Kolonie des gewünschten Klon in 2 ml LB-Medium inokuliert und für 2 h bei 37°C und 200 rpm angezogen. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Amp) und 25 µg/ml Kanamycin (Km) überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 5 ml der Vorkultur wurden in 200 ml LB Amp¹⁰⁰ Km²⁵-Medium gegeben und bis zu

einer OD_{600} von 0,5 – 0,7 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG initiiert und über Nacht bei 30°C und 200 rpm fortgeführt. Zur Zellernte erfolgten durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

LB-Medium : 1 % (w/v) BactoTrypton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % (w/v) NaCl
 Mit H_2O_{bidest} auf das gewünschte Volumen auffüllen und autoklavieren.

Antibiotika-Stammlösungen: 100 mg/ml in sterilem H_2O_{bidest} , bei -20°C gelagert.

2.2.13.1 Testung der Expressionsbedingungen für den PET101/D-TOPO-Vektor

Konnten unter den beschriebenen Überexpressionsbedingungen keine löslichen Proteine aufgereinigt werden, wurde eine Test-Überexpression durchgeführt, um verschiedene Expressionsbedingungen zu testen. Dazu wurde das Plasmid zusätzlich zu den BL21 (DE3) pSBET-b chemokompetenten Zellen auch in den Stamm HMS174 (DE3) transformiert und die Expression rekombinanter Proteine bei 20, 30 und 37°C getestet. Nach 2, 4, 6 und 20 h erfolgte die Entnahme und Aufarbeitung einer 2 ml Probe, um die Gehalte an rekombinanten Proteinen in der löslichen sowie unlöslichen Phase zu überprüfen.

Zur Expression der SAMT wurde eine 5 ml-Vorkultur mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen beimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. 700 µl daraus dienen zum Beimpfen einer 20 ml Hauptkultur. Die Expression wurde bei einer OD_{600} von 0,5-0,7 durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und erfolgte bei den zu testenden Inkubationsbedingungen. Die entnommenen Proben wurden herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.2.13.2. Testung der Expressionsbedingungen für den pET151/D-TOPO-Vektor

Zur Überexpression der SAMT1 standen drei verschiedene *E. coli*-Zelllinien zur Verfügung. Mit dem Expressionskit (Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen) wurden BL(21)Star-Zellen geliefert. Zusätzlich wurden BL(21)-Zellen mit den Helferplasmiden pSBET-b sowie pBB540 und pBB542 getestet. Die Plasmide pBB540 und pBB542 kodierten für dnaK, dnaJ, grpE, clpB, groESL, Chaperone die in hohen Konzentrationen exprimiert wurden und die korrekte Faltung und Löslichkeit rekombinanter Proteine verbessern konnten. Die Überexpression erfolgte wie im Abschnitt 2.2.13. beschrieben. Dabei reichten zur Induktion der BL21 (DE3) pBB540+pBB542-Zellen 100 µM IPTG aus. Vor der Ernte dieser

Zellen wurden diese pellettiert, das Medium entfernt und frisches Medium mit 200 µg/ml Chloramphenicol hinzugegeben. Das Antibiotikum inhibierte in dieser Konzentration jegliche Proteinbiosynthese in den Zellen und eine zusätzliche zweistündige Inkubation sollte die komplette Faltung rekombinanter Proteine fördern (de Marco, 2007).

2.2.14. Proteinaufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte affinitätschromatographisch über eine Säule Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Agarose (Qiagen). Das Prinzip beruhte auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen matrixgebundenen Bindungspartner. In diesem Fall band der (His)₆-Tag des rekombinanten Proteins an die Nickelionen, die über NTA mit der Agarose komplexiert vorlagen.

In Vorbereitung zur Aufreinigung wurden die Zellpellets unter Zugabe von 2 ml Lysispuffer je g Pellet aufgetaut und resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis für 30 min mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Das Enzym aus dem Hühnereiweiß spaltete Peptidoglykane prokaryotischer Zellwände und unterstützte somit die Lyse der Bakterienzellen. Im Anschluss erfolgte eine Ultraschallbehandlung für 8 x 10 s bei 50 Pulsen und einer Intensität von 40 % auf Eis. Durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g war es möglich die Fraktion löslicher Proteine von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen zu trennen, der Überstand wurde auf die mit Lysispuffer equilibrierte Ni-NTA Säule aufgetragen. Beim Lauf des Rohextraktes über die Säule war eine Bindung der (His)₆-markierten Proteine an die Matrix möglich. Das Waschen mit je 2 ml Waschpuffer 1 und 2 (enthielten 40 und 60 mM Imidazol) entfernte unspezifisch gebundene Proteine. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch dreimalige Zugabe von 500 µl Elutionspuffer. Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden durch eine SDS-PAGE überprüft. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die verwendeten Puffer besaßen folgende Zusammensetzung:

Tab. 2-1: Zusammensetzung von Lysis-, Wasch- und Elutionspufferlösungen zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Puffer pH 8	mM NaH ₂ PO ₄	mM NaCl	mM Imidazol	% Glycerol	mM β-ME
Lysispuffer	50	300	10	10	15
Waschpuffer 1	50	300	40	10	15
Waschpuffer 2	50	300	60	10	15
Elutionspuffer	50	300	200/250	10	15

β -Mercaptoethanol (β -ME) war direkt vor Gebrauch zuzusetzen.

2.2.15. Aufreinigung der SAMT zur Kristallisation

Zur Herstellung einer großen Menge möglichst sauberen, rekombinanten Proteins wurde die in Zubieta *et al.* 2003 und McCarth *et al.* 2007 beschriebene Prozedur modifiziert. Der Lysispuffer enthielt zusätzlich 1 % Tween. Im Anschluss an die Lysozymbehandlung für 30 min erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall bei 50 % und 50 Pulsen für 5 min auf Eis. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand auf die Ni-NTA-Säule gegeben. Zur Entfernung der Verunreinigungen folgten zwei Spülschritte mit je 10 ml Waschpuffer 1 und 2. Im Anschluss wurde das Protein in drei Elutionsschritten von je 500 μ l eluiert. Die verwendeten Puffer besaßen folgende Zusammensetzung:

Tab. 2-2: Zusammensetzung von Lysis-, Wasch- und Elutionspufferlösungen zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen zur Kristallisation

Puffer pH 8	mM Tris	mM NaCl	mM Imidazol	% Tween	% Glycerol	mM β -ME
Lysispuffer	50	500	20	1	10	15
Waschpuffer 1	50	500	40	1	10	15
Waschpuffer 2	50	500	60	0	10	15
Elutionspuffer	50	500	250	0	10	15

Eine weitere Ni-NTA-Aufreinigung musste nach dem TEV (engl. tobacco etch virus)-Verdau des rekombinanten Proteins zur Entfernung des (His)₆-Tags durchgeführt werden. Hierbei waren die Pufferbedingungen zu beachten. Der Verdau des Proteins lief in einem Puffersystem ab, dass für eine Ni-NTA-Aufreinigung ungünstig war. So enthielt der TEV-Puffer EDTA und DTT, die die Ni-Ionen von der Matrix lösten bzw. eine reduzierende Wirkung auf die Ni-Ionen hatten.

Zur erneuten affinitätschromatographischen Aufreinigung mussten die Proteine daher in ein geeignetes Puffersystem überführt werden. Dies sollte idealerweise auch eine geringe Konzentration an Imidazol enthalten, da so eine unspezifische Proteinbindung an die Säule vermindert wurde. Die Umpufferung erfolgte durch Ultrazentrifugation mit VIVASPIN 20 Zentrifugationsgefäßen gegen folgenden Puffer:

Laufpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	150 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol

Die Tris- und NaCl-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie für die anschließende gelchromatographische Aufreinigung der Proteine geeignet war.

Die Entfernung unverdauten, rekombinanten Proteins, der TEV-Protease und der abgespaltenen (His)₆-Tags erfolgte durch Bindung an die Ni-NTA-Matrix. Im Durchfluss und den sich anschließenden drei Spülschritten zu je 2 ml mit 40, 50 und 60 mM Imidazol war im Idealfall die SAMT1 ohne (His)₆-Tag vorhanden.

2.2.16. TEV-Verdau rekombinanter Proteine

Die TEV-Protease (AcTEVTM, Invitrogen) erkannte eine Sequenz von sieben AS (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) und bewirkte eine hoch spezifische Spaltung zwischen Glutamin und Glycin. Die mit Hilfe des pET151/D-TOPO-Vektors exprimierte rekombinante SAMT1 war über diese Sequenz n-terminal mit einem (His)₆-Tag versehen, welcher mit Hilfe der TEV-Protease abgespalten werden konnte. Bei einer dem Verdau folgenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnte die ebenfalls (His)₆-markierte Protease aus dem Ansatz entfernt werden.

Vorbereitend waren die Bedingungen für einen optimalen Ablauf des Verdaus auszutesten. Dazu wurden je 20 µg Fusionsprotein in einem Endvolumen von 150 µl mit 10, 15 und 20 U TEV-Protease versetzt und bei 4, 12, 20 und 30°C inkubiert. Nach 1,2,4 und 6 Stunden, sowie nach einer Inkubation über Nacht wurde je eine Probe zur PAA-Gelelektrophorese entnommen. Diese sollte Aufschluss über die Effizienz der enzymatischen Spaltung geben.

Eine Möglichkeit zum Verdau großer Mengen rekombinanten Proteins stellte die Dialyse dar. Zur Gewinnung von ausreichend Protein wurden 10 mg Fusionsprotein und 500µl TEV-Protease mit 1 x TEV-Reaktionspuffer auf ein Endvolumen von 30 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf zwei Dialyseschläuche (ROTH, MWCO 12.000-14.000, reg. Cellulose) mit einem Füllvolumen von je 15 ml aufgeteilt. Die Schläuche wurden mit Klammern verschlossen und in je 1,5 l 1 x Reaktionspuffer gehängt. Die Dialyse erfolgt in 16 h unter Rühren bei 4°C. Alle vier Stunden erfolgte ein Pufferwechsel.

1 x TEV-Reaktionspuffer	50 mM	Tris pH8
	0,5 mM	EDTA
	1 mM	DTT

2.2.17. Gelfiltration

Die Gelfiltration oder auch Größenausschlusschromatographie diente der Aufreinigung von Proteinen entsprechend ihrer Molekülgröße. Dabei passierten die Moleküle das Filtrationsmaterial, welches in eine entsprechende Säule gepackt war, ohne diese zu binden. Das Medium bildete eine poröse Matrix sphärischer Partikel, welche chemisch und physikalisch stabil und inert waren. Die Partikel wurden von Puffer durchspült und umgeben, wobei die Flüssigkeit in den Poren die stationäre Phase bildete. Die Flüssigkeit außerhalb der Partikel stellte die mobile Phase dar.

Ein Proteingemisch wurde durch eine unterschiedlich lange Passage der einzelnen Komponenten durch die Säule aufgetrennt. Dabei passierten große Moleküle außerhalb der Ausschlussgröße die Matrix mit der Pufferfront. Je kleiner die Proteine waren, je länger dauerte ihre Passage durch die Säule.

Zur Trennung der SAMT von Verunreinigungen und Resten von TEV-Protease sowie nicht gespaltenem rekombinanten Protein wurde eine XK 16/100-Säule (Pharmacia) mit dem Gelfiltrations-Material Sephacryl S-100 HR (Amersham Biosciences) gepackt verwendet. Die Säule wurde in die FPLC-Anlage (Pharmacia) integriert und die aufgetrennten Proteinfractionen mit dem Fraction collector SuperFrac (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gesammelt. Während des Laufes wurde die Proteinkonzentration am Ausgang der Säule bei 595 nm dokumentiert. Dies diente zur späteren Auswahl geeigneter Fraktionen zur Konzentrierung. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml. Die Flussrate lag bei 0,25 ml/min.

Laufpuffer: 50 mM Tris HCl pH 8
 150 mM NaCl

2.2.18. Protein-Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Fraktionen und Eluatzen wurde der BRADFORD-Assay genutzt (Bradford, 1976). Bei dieser Methode stand der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau im Mittelpunkt. Dessen Absorptionsmaximum verschob sich in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 465 auf 595 nm. Grund dafür war die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein, welche die unprotonierte, anionische Form des Farbstoffs stabilisierte (Lottspeich & Zorbas 1998). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einzelner Lösungen wurden Doppel-Bestimmungen in folgender Zusammensetzung durchgeführt:

700 µl H₂O_{bidest}
100 µl Proteinlösung in Puffer
200 µl BRADFORD-Reagenz

Nach Zugabe des BRADFORD-Reagenz wurden die Ansätze mindestens 10 min (max. 60 min) bei RT inkubiert und photometrisch bei 595 nm vermessen (Ultrospec 3000). Die Proteinlösungen wurden in dem jeweils für die Anreinigung genutzten Puffer verdünnt und die Konzentration mit Hilfe einer BSA-Eichreihe (1-10 µg/µL) berechnet.

2.2.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteine wurde die denaturierende Elektrophorese in Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) verwendet. Als anionisches Detergenz überdeckte SDS die Eigenladung von Proteinen, sodass Micellen entstanden, deren negative Ladung der Masse des Proteins entsprach (Stryer 1999). Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit einem SDS-Überschuss auf 95°C erhitzt, wobei fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen zerstört wurden. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduzierte dabei die Disulfid-Brücken innerhalb der Proteine. Im elektrischen Feld wanderten die Proteine je nach ihrem Molekulargewicht (kleine schneller als große) zur Kathode und wurden somit aufgetrennt. Standards ermöglichten die Ermittlung des Molekulargewichts einzelner Proteine. Zur Herstellung von zwei Gelen waren folgende Lösungen zusammenzufügen:

Tab. 2-3: Zusammensetzung von 10 %igen SDS-PAA-Gelen

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Trenngelpuffer pH 8,8	2,25 ml	-
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	0,83 ml
H ₂ O _{bidest}	3,75 ml	2,00 ml
Acrylamidlg. 30 %	3,00 ml	0,44 ml
APS 10 %	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,01 ml	0,005 ml

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS
 4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
 SDS Laufpuffer: 50 mM Tris; 380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3

Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Das Gemisch wurde auf das Gel aufgetragen und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstant 120 V für ca. 90 Minuten. Anschließend wurden die Gele fixiert und Coomassie gefärbt.

5 x Probenpuffer: 32 % (v/v) 1 M Tris-HCl-Lösung pH 6,8

50 % (v/v)	Glycerol
12,5 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
10 % (w/v)	SDS

5 x SDS- Laupuffer:	1,9 M	Glycin
	0,25 M	Tris basisch
	30 mM	SDS

2.2.20. Coomassiefärbung von Proteingelen

Diese Färbemethode beruhte auf der direkten Anfärbung der Proteine im Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff. Je nach Farbbindevermögen des jeweiligen Proteins konnten 30 ng bis 1 μ g eines Proteins nachgewiesen werden (Lottspeich & Zorbas 1998). Proteine von ca. 10 AS Unterschied ließen sich auf diese Weise differenzierbar darstellen (Stryer, 1999).

Zunächst erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel für mindestens 15 min bei RT. Anschließend wurden die Gele für mindestens 2 h gefärbt. Überschüssiger Farbstoff war mit 10 % Essigsäure zu entfernen. Die Gele wurden durch Trocknung konserviert. Dazu dienten NOVEX- Gel Trocknungsstände und Cellulosefolie (Invitrogen).

Fixierer:	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	40 % (v/v)	H ₂ O _{bidest}
Färbelösung:	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,006 % (w/v)	Coomassie R250
	90 % (v/v)	H ₂ O _{bidest}
Entfärber:	10 % (v/v)	Essigsäure
	90 % (v/v)	H ₂ O _{bidest}

2.2.21. Silberfärbung von Proteingelen modifiziert nach Blum (Blum *et al.* 1987)

Bei der Silberfärbung handelte es sich um eine sehr sensitive Methode, deren Nachweisgrenze bei 0,1-1 ng je Bande lag (Rabilloud *et al.* 1988). Dabei wurden nach der Fixierung einige Silber-Ionen von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Ein starkes Reduktionsmittel reduzierte alle Silberionen im Gel zu metallischem Silber. Da dies schneller in der Nähe der Silberkeime stattfand, färbten sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz. Waren die Proteinbanden gut angefärbt, musste die Reaktion gestoppt werden, da sonst alle Silberionen im Gel reduziert wurden.

Das Abstoppen erfolgte durch eine starke pH-Änderung. Um Hintergrundfärbung und Artefakte zu vermeiden, war bei der Silberfärbung sehr auf Sauberkeit bei der Handhabung und den verwendeten Chemikalien und Lösungen zu achten. Die folgende Tabelle zeigt die Abfolge und Dauer der einzelnen Färbeschritte.

Tab. 2-4: Reihenfolge, Dauer und notwendige Lösungen zur Silberfärbung von Proteingelen (Blum *et al.* 1987)

Inkubationsschritte	Inkubationsdauer	Lösung
1	1-24 h	Fixierer
2-4	20 min	50 % Ethanol
5	60 s	Thiosulfatlösung
6-8	20 s	H ₂ O _{bidest}
9	20 min	Imprägnierer
10-11	20s	H ₂ O _{bidest}
12	Bis Banden sichtbar sind	Entwickler
13	10 s	H ₂ O _{bidest}
14	10 min	Stopplösung
15-16	10 s	H ₂ O _{bidest}

Fixierer: 25 % Isopropanol
10 % Essigsäure

Thiosulfat: 20 mg Na₂S₂O₅ x 5H₂O
Ad. 100 ml mit H₂O_{bidest}

Imprägnierer: 0,2 g AgNO₃
75 µl Formaldehyd
Ad. 100 ml mit H₂O_{bidest}

Entwickler: 6 g Na₂CO₃
50 µl Formaldehyd
2 ml Thiosulfatlösung
Ad. 100 ml mit H₂O_{bidest}

Stopplösung: 1,86 g EDTA pH 7,8
Ad. 100 ml mit H₂O_{bidest}

2.2.22. Western-Blot

Zur Überprüfung der Überexpression sowie der Löslichkeit der Proteine wurde ein Western-Blot durchgeführt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf einen Träger, in diesem Fall eine Nitocellulose-Membran (ROTH), übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Zur Durchführung des Proteintransfers auf die Membran wurde die NOVEX XCell II Mini-Cell (Invitrogen) genutzt. Entsprechende Schwämme und Filterpapierstücke wurden vor Benutzung in $\frac{1}{2}$ Towbin-Puffer getränkt und die Bestandteile in folgender Reihenfolge in die Blotkammer gelegt: 2 Schwämme, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwämme.

Die Membran wurde zunächst mit destilliertem Wasser getränkt, dann mit $\frac{1}{2}$ Towbin-Puffer equilibriert und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Eventuell entstehende Blasen konnten durch Überstreifen mit einem Reagenzglas entfernt werden. Dies sollte einen vollständigen Proteintransfer ermöglichen. Wurden mehrere Gele in einer Kammer gleichzeitig geblottet, wurden diese durch Filterpapier und Schwamm getrennt. Vor dem Transfer wurde die Kammer mit Schwämmen aufgefüllt, zusammengebaut und mit Puffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von zwei Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA.

$\frac{1}{2}$ Towbin-Puffer, pH 8,3:	0,096 M	Glycin
	0,012 M	Tris
	20 % (v/v)	Methanol

2.2.22.1 Färbung mit Ponceau S rot

Der Farbstoff Ponceau S wurde dazu genutzt, den Proteintransfer nach dem Blot-Vorgang zu überprüfen, da er Proteine bindet.

Dazu erfolgte eine Überschichtung der Membran mit Ponceau S-Färbelösung und eine anschließende Inkubation für 2-5 min. Die Farblösung wurde abgegossen und die Membran vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült. Proteinfreie Regionen entfärbten sich nach und nach und die rot gefärbten Proteinbanden wurden sichtbar. Auf diese Weise konnte nachvollzogen werden, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran übertragen wurden. Durch weiteres Spülen konnte die Membran vollständig entfärbt und entwickelt werden.

Färbelösung:	0,5 % (w/v)	Ponceau S rot
	1 % (v/v)	Essigsäure

2.2.22.2. Immundetektion

Mit Hilfe spezifischer Antikörper (AK) bestand die Möglichkeit einzelne Proteine nachzuweisen. Zur Detektion der aufgereinigten SAMT wurde ein Poly-His-AK verwendet, der spezifisch den fusionierten (His)₆-Rest am exprimierten Protein band. Zur Visualisierung dieser Antigen(AG)-AK-Reaktion diente ein sekundärer AK, konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase. Hierbei handelte es sich um einen vollständigen Goat Anti-rabbit IgG (SIGMA). Durch Zugabe eines für die alkalische Phosphatase umsetzbaren Substrates war eine Visualisierung der AG-AK-Bindung möglich. Geeignete Substrate stellten CSPD, CDP-Star und NBT/BCIP dar. CSPD und CDP-Star wurden durch die alkalische Phosphatase enzymatisch dephosphoryliert, sodass ein *meta*-stabiles Dioxetan Phenolat-Anion entstand. Dieses zerfiel und emittierte in gepufferter Lösung Licht der Wellenlänge 477 nm. Die Lumineszenz wurde im LAS-1000 detektiert. Das Prinzip der NBT/BCIP-Reaktion beruhte auf der Hydrolyse von BCIP sowie der Reduktion von NBT. Es entstand ein tiefviolett gefärbtes, unlösliches Endprodukt.

Die mit TBS-Triton angefeuchteten Membranen wurden wie folgt behandelt:

1. Absättigen freier Proteinbindungen: über Nacht mit Blockierungslösung
2. Spülen mit TBS-Triton
3. Inkubation mit primärem AK: 2 h, AK 1:1000 verdünnt in Blockierungslösung
4. 3-mal 10 min waschen mit TBS- Triton
5. Inkubation mit sekundärem AK: 1,5-2 h, AK 1:20000 verdünnt in TBS-Triton
6. 6-mal 5 min waschen in TBS-Triton
7. 6-mal 5 min waschen in TBS
8. 10 min waschen in Detektionspuffer

Anschließend erfolgte die Entwicklung mit CSPD. Die Stammlösung wurde dazu 1:200 in Detektionspuffer verdünnt und jede Membran mit 1 ml der Lösung bedeckt. Diese wurde für 10 min in Folie geschlagen und bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Flüssigkeit mit Zellstoff abgetupft und eine weitere Inkubation bei 37° C im Dunkeln angeschlossen. Nach 15-30 min war die Chemilumineszenz mit dem Image-Reader (Fuji) detektierbar.

Ergänzend konnte eine Färbung der Banden mittels NBT/BCIP angeschlossen werden. Dazu wurden je ml Detektionspuffer 3 µl NBT-Lösung und 1,5 µl BCIP-Lösung gegeben und gemischt. Die Membranen wurden mit dem Gemisch überschichtet und im Dunkeln bei RT inkubiert, bereits nach wenigen Minuten zeigten sich violett gefärbte Banden. Die Reaktion wurde durch Spülen mit Wasser gestoppt.

Blockierungslösung:	4 % (w/v) 1 % (w/v) in TBS-Triton	Magermilchpulver BSA
10 x TBS- Stammlösung, pH 7,4:	0,2 M 5 M	Tris NaCl
1 x TBS-Triton:	0,05 % (v/v) 10 % (v/v)	Triton X-100 10 x TBS
Detektionspuffer, pH 9,5:	0,1 M 0,1 M Autoklavieren, anschließend Zugabe von 0,05 M	Tris NaCl MgCl ₂ x 6H ₂ O

2.2.23. Funktionsnachweis rekombinanter Proteine mittels GC-MS

Zum Nachweis der Funktion der SAMT in der Bakteriensuspension wurde die Vorkultur wie im Abschnitt 2.2.13. hergestellt. Aus dieser wurden 2 ml in 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen. Nun erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG sowie 1 mM des jeweiligen Substrates. Die verschiedenen Mutanten wurden mit SA, BA (50 mM in Ethanol) sowie beiden Substraten zu gleichen Konzentrationen getestet. Als Negativkontrollen diente die Kultur ohne Substrat bzw. mit Ethanol. Nach der Inkubation über Nacht bei 30°C erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 10000 x g und 4°C und je 35 ml Kulturüberstand wurden mit 5 ml Hexan ausgeschüttelt. Eventuell entstandene flüchtige Substanzen konnten auf diese Weise aus dem Medium extrahiert werden. Zur Phasentrennung erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min. Ein ml der organischen Phase wurde in ein Probengefäß für das GC-MS gegeben (QP5000, Shimadzu), gaschromatographisch aufgetrennt und im Massenspektrometer detektiert. Die gaschromatographische Analyse der organischen Phase erfolgte unter folgenden Parametern:

Injektion:	1 µl, splitless
Injektortemperatur:	200°C
Interface Temperatur:	300°C
Temperaturprogramm des Ofens:	Beginn bei 35°C, Dauer 2 min Hochheizen auf 280°C, bei einer Rate von 10°C/min, Halten für 15 min.
Kapillarsäule:	DB-5; 60 m x 0,25 mm x 0,25 µM
Einstellungen MS:	1,3 kV detector voltage, solvent cut time 10 min, m/z von 41-280, Scanrate 0,5sec

2.2.24. Radioaktiver Enzymaktivitäts-Test

Zum Nachweis der Aktivität des heterolog exprimierten und aufgereinigten Proteins wurde ein *in vitro* Assay mit radioaktiv markiertem SAM ([Methyl- ^{14}C]-S-Adenosyl-L-Methionin) als Methylgruppen-Donor genutzt (Pichersky *et al.* 1994). Dabei übertrug die Methyltransferase das ^{14}C -SAM auf das Substrat z.B. SA wobei radioaktiv markierte Produkte entstanden. In der Produkt-Phase war dabei die Radioaktivität der Menge an entstandenem Produkt proportional. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Szintillationsmessung. ^{14}C als Quelle ionisierender Strahlung zerfiel im β -Zerfall. Die Kristalle des Szintillators wurden durch die ionisierende Strahlung zur Abgabe von Lichtblitzen angeregt, welche über einen Sekundärelektronenvervielfacher sehr empfindlich detektiert werden konnten (Lottspeich & Zorbas 1998). Der Test wurde zur Bestimmung des Substratspektrums der *H. c.* SAMT und der einzelnen Mutanten sowie zur biochemischen Charakterisierung der Enzyme verwendet. Eingesetzt wurden die Eluate der Affinitätschromatographie, die die gereinigte SAMT enthielten. Je nach Aktivität der Proteine wurden zwischen 0,5 und 2,5 μg Protein eingesetzt:

x μl	Proteinlösung
10 μl	HEPES-Inkubationspuffer pH 6,8
1 μl	Substrat (0,05 M in Ethanol)
1 μl	C^{14} -SAM
x μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 50 μl

Für jede Bestimmung wurden mindestens zwei Ansätze hergestellt. Als Negativkontrollen dienten zum einen Ethanol statt des Substrates, zum anderen ein für 5 min bei 95°C hitzeinaktivierter Ansatz.

Die Lösungen wurden auf Eis in Reaktionsgefäße pipettiert, wobei das ^{14}C -SAM erst direkt vor dem Start der Reaktion zugegeben war. Nach dem Mischen und Anzentrifugieren des vollständigen Ansatzes folgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Durch anschließende Zugabe von je 3 μl 6 M HCl stoppte die Reaktion und das Produkt wurde in 100 μl Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation trennte sich deutlich die organische von der wässrigen Phase und je 30 μl der organischen Phase wurden in 2 ml Szintillations-Flüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität wurde nun im Szintillator (TriCarb, Packard BioScience) gemessen, wobei als Leerwert reine Szintillations-Flüssigkeit diente. Zur Berechnung wurde ebenfalls eine Positivkontrolle benötigt. Dazu diente die wässrige Phase der hitzeinaktivierten Kontrolle, denn die Radioaktivität entsprach der eingesetzten Menge an ^{14}C -SAM, da in diesem Ansatz kein Umsatz stattfinden konnte. Laut Herstellerangaben enthielt 1 μl Reaktionslösung 384 pmol ^{14}C -SAM. Die für die 30 μl erhaltenen dpm-Werte

wurden auf die 100 µl organische Phase hochgerechnet. Der ermittelte Wert korrelierte mit der Menge an markiertem Produkt. Der Umsatz wurde auf 1 mg Protein und je Minute Inkubationszeit berechnet und in $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ angegeben.

HEPES-Inkubationspuffer, pH 6,9: HEPES 250 mM
 KCl 25 mM

2.2.24.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Imidazolkonzentration

Imidazol kam als phenolische Substanz in relativ hohen Konzentrationen in den Eluaten aufgereinigter rekombinanter Proteine vor. Ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen dieser Substanz auf die Aktivität der SAMT sollte untersucht werden. Dazu wurden die Aktivitäten von Eluaten des SAMT3-Wildtyps im Enzymtest unter Zugabe von Imidazol untersucht. Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen einer 1 M Imidazol-Stammlösung wurden Endkonzentrationen von 50, 100, 150, 200 und 250 mM im Enzymsatz erzeugt und die jeweilige Produktbildung dokumentiert.

2.2.24.2. Untersuchung der Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspektren der *H. c.* SAMT sowie ihrer Mutanten wurden verschiedene Derivate von Benzoe- und Zimtsäure, sowie Jasmon-, Anthranil- und Nikotinsäure verwendet. Die Substrate wurden wie beschrieben im Enzymtest eingesetzt (2.2.24.). Mit Ausnahme von Nikotinsäure (50 mM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) lagen alle Substrate zu 50 mM in Ethanol gelöst vor.

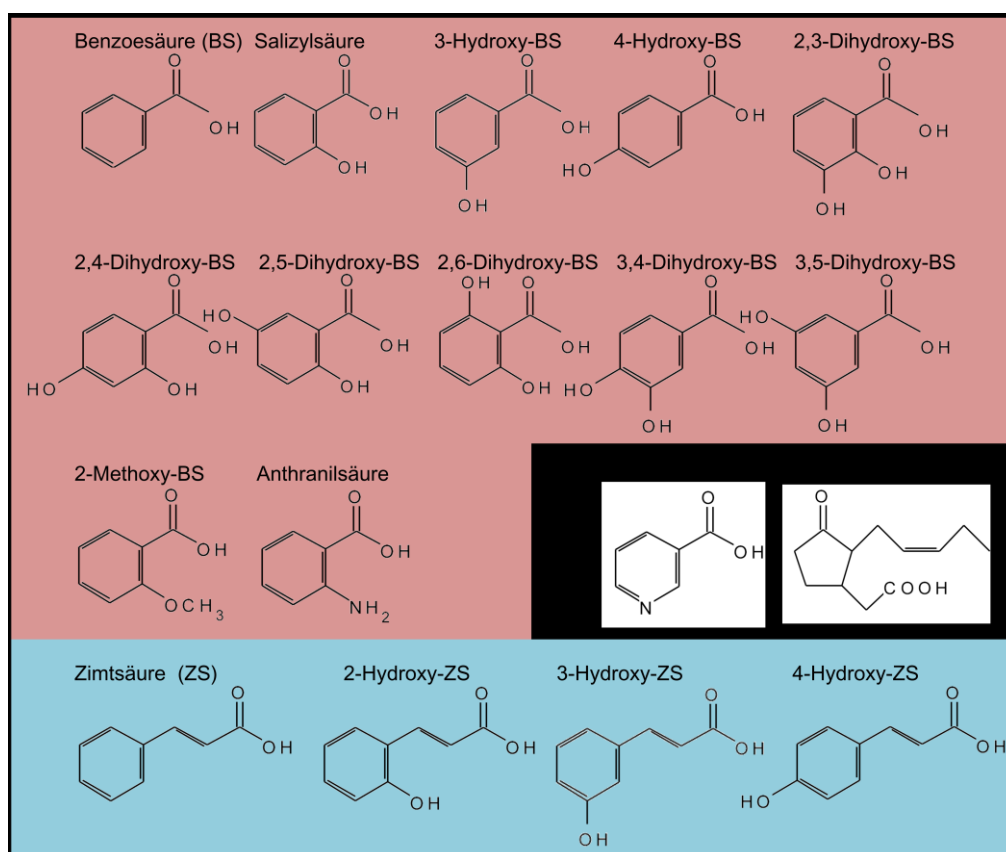


Abb. 2-1: Im radioaktiven Enzymtest verwendete Substrate zur Bestimmung des Substratspektrums der *H. c.* SAMT Wildtyp-Enzyme sowie ihrer Mutanten
Benzoessäure und ihre Derivate (rosa hinterlegt), Zimtsäure (ZS) und ihre Derivate (hellblau hinterlegt), Nikotinsäure als Pyridinderivat, Jasmonsäure.

2.2.24.3. Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine arbeiteten nach der Michaelis-Menten-Kinetik. Um zu bestimmen, wie schnell ein Enzym eine chemische Reaktion katalysiert, wurden enzymkinetische Parameter ermittelt. Dazu diente die Michaelis-Menten-Gleichung. Sie beschrieb einen hyperbolen Verlauf der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration. Die Hyperbel zeigte bei geringen Substratkonzentrationen einen linearen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei beginnender Substratsättigung näherte sich die Reaktionsgeschwindigkeit einem maximalen Wert an (v_{\max}). Von v_{\max} ließ sich die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}/2$ ableiten. Die Substratkonzentration, die bei $v_{\max}/2$ vorlag, entsprach dem K_M -Wert (Michaelis-Konstante) des Enzyms für das entsprechende Substrat. Die Michaelis-Konstante bildete die wichtigste Kenngröße für eine enzymatische Reaktion. Eine weitere, wichtige Größe stellte die Wechselzahl k_{cat} als Maß für die Effizienz eines Enzyms dar. Die Wechselzahl (k_{cat}) oder auch molare Aktivität gab dabei die Zahl der Substratmoleküle an, die ein Enzym bei vollständiger Substratsättigung je Zeiteinheit in das Produkt umwandelte. Die katalytische Effizienz eines Enzyms wurde aus dem Quotienten der Wechselzahl und der Michaelis-Menten-Konstante berechnet.

Die direkt lineare Darstellung der enzymatischen Reaktion eignete sich sehr gut zur Ableitung der enzymkinetischen Parameter. Dazu war eine Aufnahme von Zeit-Umsatzkurven für viele Substratkonzentrationen nötig. Da dies im enzymatischen Enzymassay nicht realisiert werden konnte, wurden Endpunktbestimmungen zur Ermittlung der Parameter durchgeführt. Für niedrige und hohe Substratkonzentrationen wurden zunächst Zeit-Umsatzkurven aufgenommen und zum Abstoppen der Reaktion ein Zeitpunkt im Bereich der linearen Abhängigkeit gewählt. Dann wurde die Substratbildung mit steigender Substratkonzentration in der zuvor bestimmten Zeit ermittelt. Die Konzentrationen lagen dabei im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kurve bis in den Bereich der beginnenden Sättigung. Zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter wurden verschiedene Linearisierungsverfahren verwendet, zum Beispiel nach Lineweaver-Burk. Dabei handelte es sich um eine doppelt reziproke Darstellung, bei der $1/v$ als Funktion von $1/[S]$ aufgetragen wurde. K_M und v_{\max} konnten direkt aus den Schnittpunkten mit der x-

Achse ($-1/K_M$) und der y-Achse ($1/v_{\max}$) abgeleitet werden. Durch Messfehler war jedoch eine erhebliche Verfälschung der Linearisierungsverfahren möglich, so konnten bei Lineweaver-Burk schon geringe Abweichungen in v bei kleinen Substratkonzentrationen $[S]$ zu großen Abweichungen in $1/v$ führen. Auch Ergebnisse durch die Linearisierungsverfahren nach Eadie-Hofstee und Hanes-Wilkinson wurden durch Messfehler verfälscht. Daher war eine sehr genaue Arbeitsweise und eine Nutzung mehrerer Linearisierungsverfahren erforderlich. Es erfolgte die Bestimmung von K_M und v_{\max} für SA und BA bei der SAMT3 und den sechs aktivsten Mutanten der *H. c.* SAMT1 und 3. Die zu nutzenden Inkubationszeiten und Substratkonzentrationen wurden für jedes Enzym mit dem jeweiligen Substrat ermittelt. Bei der Mutante Val231Phe wurden die Parameter nur für den Umsatz von SA bestimmt, da das Enzym mit BA keine Aktivität zeigte. Die Tabelle zeigt die Parameter für die einzelnen Enzyme.

Tab. 2-5: Verwendete Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten zur Bestimmung von K_M und v_{\max} für SA und BA der *H. c.* SAMT3 und sechs Mutanten der *H. c.* SAMT1 und 3

<i>H. c.</i> SAMT	Substrat	Substratkonzentrationen [mM]	Inkubationszeit [min]
SAMT3	SA	0,05-0,7	30
	BA	0,05-0,7	30
SAMT3 Met156His	SA	0,05-0,5	6, 12
	BA	0,05-0,5	6
SAMT1 Leu216Met	SA	0,05-0,5	15
	BA	0,3-0,8	20
SAMT3 Val231Ile	SA	0,05-0,5	30
	BA	0,1-0,7	20
SAMT3 Val231Phe	SA	0,1-0,6	25
SAMT3 Phe357Tyr	SA	0,1-0,6	20
	BA	0,1-0,6	20
SAMT1 Met157His+Leu216Met	SA	0,05-0,5	25
	BA	0,05-0,5	25

2.2.25. *In silico*-Modellierung der *H. c.* SAMT

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der *C. b.* SAMT führte zur Identifizierung der an der Substratumsetzung beteiligten AS (Zubieta *et al.*, 2003). Die ermittelte Struktur bildete die Grundlage zur Modellierung weiterer, verwandter Methyltransferase wie der *H. c.* SAMT. Eine *in silico*-Modellierung des Enzyms sollte die Beteiligung der entsprechenden AS bestätigen und mögliche räumliche Veränderungen durch Mutationen visualisieren. Die Modellierung wurde mit Hilfe des Pdb Viewers von SwissProt durchgeführt (Guex & Peitsch 1997). Zunächst war das Strukturfile der *C. b.* SAMT (1M6E_X), welches in der Strukturdatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Wang *et al.* 2007) zu finden war, in das Programm zu laden. Die AS-Sequenz des zu modellierenden Proteins wurde im Anschluss hinzugefügt. Diese Proteinsequenz wurde als lineares Molekül neben der 3D-Struktur dargestellt. Nun folgte ein Alignment, wobei die Proteinsequenz strukturell über die Struktur der *C. b.* SAMT gelegt wurde. Traten beim Alignment des Swiss Pdb Viewers Fehler auf, konnten diese nach Vorlage eines ClustalW-Alignments korrigiert werden (Chenna 2003). Ungenauigkeiten traten bei Lücken im Alignment auf. Diese entstanden dadurch, dass einzelnen Regionen der Zielsequenz keine Entsprechungen in der Struktur zugeordnet werden konnten. Für solche Abschnitte der Proteinsequenz waren mögliche räumliche Anordnungen zu ermitteln. Dies erfolgt mit der frei nutzbaren Software Superlooper der Bioinformatik der Charité Berlin (Hildebrand *et al.* 2009). Das Programm war in der Lage, einem Sequenzabschnitt mögliche räumliche Strukturen zuzuordnen und in ein Modell zu integrieren. Die Entscheidung über die passende Struktur lag beim Bearbeiter. Das neu erstellte Modell musste nun einer Energieminimierung unterzogen werden. Dabei wurden Bindungswinkel und –längen optimiert. Diese Optimierung erfolgte ebenfalls mit dem Swiss Pdb Viewer (Guex & Peitsch 1997). Die Ausgabe der Energieminimierung ordnete jedem Rest einen Zahlenwert zu, der idealerweise negativ sein sollte. Sehr hohe Werte wiesen auf ungünstig ausgerichtete Bindungen hin. Traten solche Werte auf, war die Energieminimierung auch mehrfach zu wiederholen. Im Ergebnis sollten möglichst alle entscheidenden AS und die Summe aller Energien negative Werte aufweisen. Nach erfolgreicher Energieminimierung wurden die Wasserstoffatome entfernt.

Um eine Vorstellung von der möglichen räumlichen Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum zu bekommen, wurden SAH und SA aus dem Modell der *C. b.* SAMT in das neu erstellte Modell übernommen. Dies diente jedoch nur als Orientierung. Eine realistische Anordnung der Substrate im neu modellierten aktiven Zentrum musste durch Docking-Experimente simuliert werden. Diese gaben aus, wie ein Substrat mit größter Wahrscheinlichkeit im aktiven Zentrum liegt. Ein Docking erstellter Modelle mit

verschiedenen Substraten wurde mit der Software GOLD unter Standardbedingungen (Verdonk *et al.* 2003) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Molecular Modelling-Theoretische Wirkstoffbiochemie“ am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Mutagenese

Als Ausgangsmaterial zur Mutagenese diente die von Heidebrecht 2005 klonierte *H. c. samt1* c-DNA im pET101/D-TOPO-Vektor. Das Plasmid enthielt das *samt1*-Fragment und ermöglichte die IPTG-induzierte Expression eines Proteins, welches C-terminal mit einem His-Tag fusioniert war. Die Selektion erfolgte durch ein enthaltenes Ampicillin-Resistenz-Gen. Das Konstrukt hatte eine Größe von 6857 bp (Abb. 3-1).

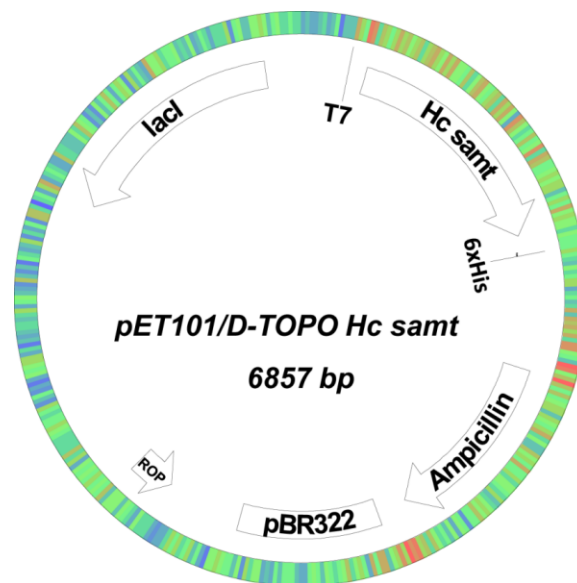


Abb. 3-1: Plasmidkarte des pET101-D/TOPO-Vektors (Invitrogen) mit dem *H. c. samt*-Fragment, C-terminalem His-Tag, *lacI*-Gen und Ampicillin-Resistenz-Gen (Plasmidkarte erstellt mit pDRAW32, www.acaclone.com, T rot, C blau, A grün, G gelb)

Zur Insertion der Mutationen wurden die in Abschnitt 2.1.3. aufgelisteten Primer verwendet. Für eine AS-Substitution wurden die jeweiligen komplementären Primer verwendet. Die Amplifikation erfolgte wie im Abschnitt 2.2.1.2. beschrieben. Nach der Entfernung der parentalen DNA durch *DpnI*-Verdau erfolgte die Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Abb. 3-2 zeigt die Produkte, die sich aus der Einführung der Einzelmutationen ergaben. Das Plasmid besaß eine Größe von ca. 7 kb, dies entsprach der größeren Bande im Gel.

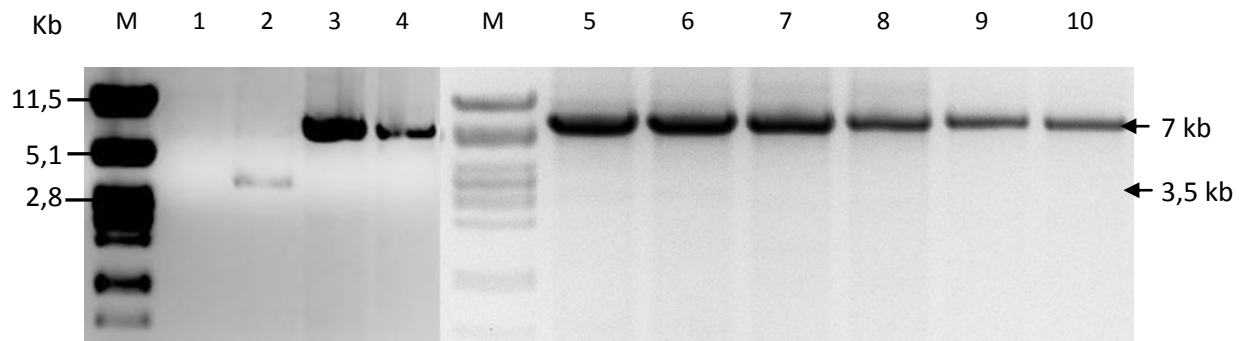


Abb. 3-2: Agarosegele der PCR-Produkte nach der Einführung einzelner Mutationen in die *H. c. samt1* im pET101/D-TOPO-Vektor mittels gerichteter Mutagenese

M	DNA-Größenstandard (λ PstI verdaut)			
1	Met156His	6	Val231Phe	
2	Leu216Met	7	Val321Phe	
3	Trp232Leu	8	Val321Tyr	
4	Phe357Thr	9	Phe357Ser	
5	Val231Ile	10	Phe357Tyr	

Die PCR zur Substitution von Methionin gegen Histidin an der Position 156 ergab kein sichtbares Produkt (Abb. 3-2, Spur 1). Dieses konnte auch nicht mit der sukzessiven Herabsetzung der Annealing-Temperatur von 49,5°C um je 0,5°C auf 47,0°C erreicht werden. Diese Strategie führte im Falle der Mutante Leu216Met zu einer deutlichen Erhöhung der Produktmenge. Hierbei reichte eine Herabsetzung der Annealing-Temperatur von 54,5°C auf 50°C in 7 Schritten. Neben dem gewünschten Produkt von ca. 7 kb trat auch eine unspezifische Banden von ca. 3,5 kb im Gel auf (Abb. 3-3, Spur 2).

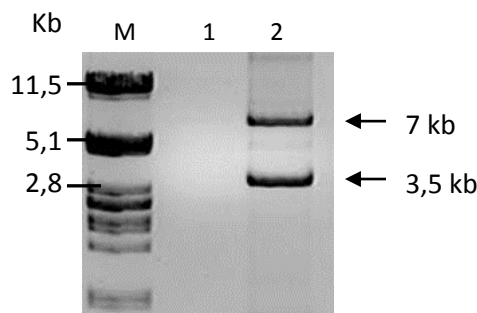


Abb. 3-3: Agarosegele der Produkte der Mutagenese-PCR zur Erzeugung der *H. c. SAMT*-Mutanten Met156His und Leu216Met mit schrittweiser Herabsetzung der Annealingtemperatur.

M	DNA-Größenstandard (λ -DNA, PstI verdaut)			
1	Met156His	2	Leu216Met	

Zur weiteren Bearbeitung wurde ein 1,8 %-iges Agarose-Gel hergestellt, aus welchem dann die entsprechende Bande von ca. 7 kb herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des

Gelelutionskits von Qiagen gewonnen wurde (**2.2.3.**). Im Fall der Mutation Met156His wurde der PCR-Ansatz trotz nicht nachweisbarem Produkt zur Transformation von chemokompetenten XL1-blue *E. coli*-Zellen verwendet. Die Selektion der transformierten Klone erfolgte auf LB Amp¹⁰⁰-Platten. Alle Transformationen führten zur Selektion positiver Klone. Diese wurden auf einer Masterplatte angelegt bzw. in Glycerolstocks gelagert. Von vier Klonen jeder Mutation wurden Kulturen zur Minipräparation hergestellt. Die Minipräparation erfolgte nach Qiagen (**2.2.7.**). Eine Sequenzierung der Mutanten sollte zeigen, dass die Mutationen inseriert und der *samt*-Leserahmen des Weiteren unverändert vorlag.

Zur Herstellung der Doppelmutanten wurden korrekt amplifizierte Einfachmutanten verwendet. Abb. 3-4 zeigt die PCR-Produkte nach der Einführung der zweiten Mutation. Resultierten aus einer Reaktion mehrere Produkte, wurde das Fragment von ca. 7 kb Größe eluiert, transformiert und sequenziert.

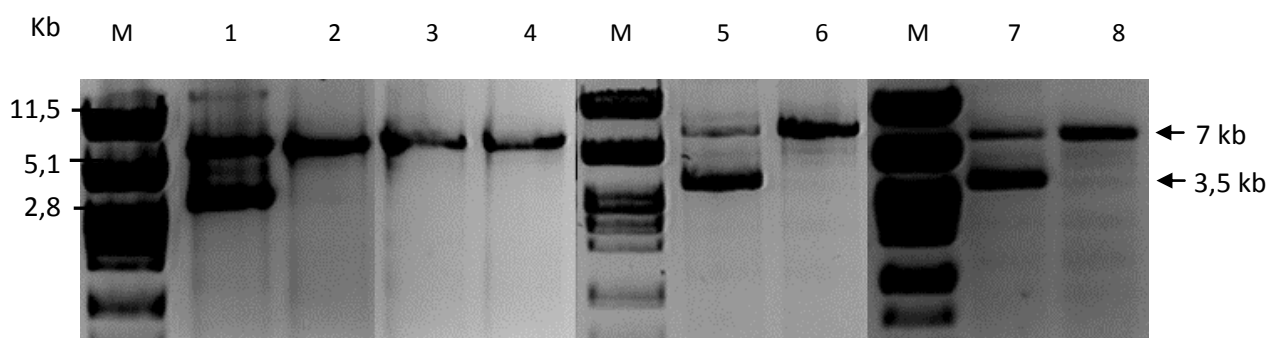


Abb. 3-4: Agarosegele der PCR-Produkte von Doppelmutanten aus zuvor hergestellten Einfachmutanten mittels gerichteter Mutagenese

M	DNA-Größenstandart (λ -DNA, <i>Pst</i> I verdaut)			
1	Met156His+Leu216Met	5	Met156His+Leu216Met	
2	Met156His+Phe357Thr	6	Met156His+Trp232Leu	
3	Leu216Met+Trp232Leu	7	Phe357Thr+Leu216Met	
4	Leu216Met+Phe357Thr	8	Phe357Thr+Trp232Leu	

Analog wurden Plasmide mit zwei korrekt inserierten Mutationen für die Einführung einer dritten Mutation genutzt. Daraus resultierende PCR-Produkte sind in Abb. 3-5 zu sehen. Die aus der Minipräparation gewonnene DNA wurde zur Sequenzierung und weiteren Transformation verwendet und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

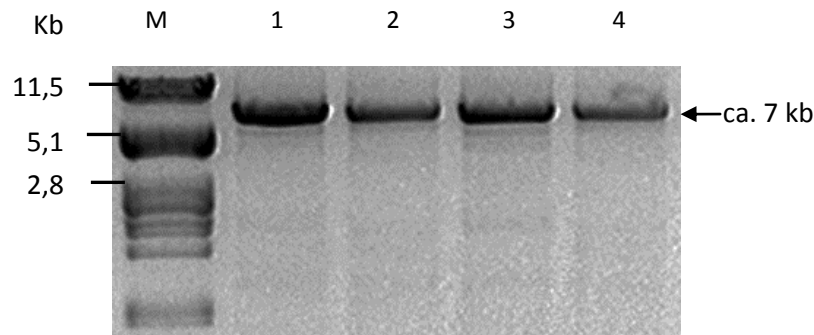


Abb. 3-5: Agarosegele der PCR-Produkte von Dreifachmutanten aus zuvor hergestellten Doppelmutanten mittels gerichteter Mutagenese

M	DNA-Größenstandard (λ-DNA, <i>PstI</i> verdaut)
1	Met156His+Phe357Thr+Trp232Leu
2	Met156His+Leu216Met+Trp232Leu
3	Met156His+Leu216Met+Phe357Thr
4	Leu216Met+Trp232Leu+Phe357Thr

3.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels des SequiTherm EXEL II DNA Sequencing Kit-LC (Biozym) sowie durch die GATC Biotech AG (Konstanz).

3.2.1. Wildtypen

Bei der Sequenzierung des *H. c. samt*-Wildtypen konnten drei verschiedene Sequenzen nachgewiesen werden, davon zwei in der vorliegenden Arbeit. Eine Sequenz entsprach der *samt1* aus der Arbeit von Heidebrecht 2005. Heidebrecht konnte neben der *samt1* noch eine zweite Sequenz identifizieren: Die *samt2* unterschied sich von der *samt1* in neun Nukleotiden, was sechs Unterschiede auf AS-Ebene bewirkte (AS 27, 32, 111, 118, 143, 214). In der vorliegenden Arbeit trat eine dritte Sequenz (*samt3*) auf, welche sich auf AS-Ebene nur an der Position 215 von der *SAMT1* unterschied. Die Tabelle 3-1 fasst die Unterschiede innerhalb der *H. c. SAMT*-Sequenzen zusammen. Alle Unterschiede betrafen AS, die sich außerhalb des vorhergesagten aktiven Zentrums befanden.

Tab. 3-1: Variable Positionen innerhalb der AS-Sequenzen der *H. c.* SAMT1, 2 und 3. Abweichende AS sind durch Fettdruck hervorgehoben.

AS-Position	SAMT1	SAMT2	SAMT3
27	Met	Lys	Met
32	Ala	Thr	Ala
111	Ser	Gly	Ser
118	Glu	Lys	Glu
143	Asn	Tyr	Asn
215	Phe	Ile	Ile

3.2.2. Mutanten

Nach der Mutagenese und Selektion einzelner Klone wurden zwei bis vier Klone jeder Mutation sequenziert. Es wurde überprüft, ob die jeweilige Mutation eingefügt worden ist und die *samt* ansonsten unverändert vorlag. Von vier Klonen wiesen zumeist zwei bis drei die gewünschte Mutation auf. Bei der Mutante Met156His kam es zu einem Nukleotid-Austausch, der jedoch keinen AS-Austausch bewirkte. Die folgende Tabelle listet die Einfachmutanten mit den entsprechenden, gewünschten und nicht gewünschten AS-Substitutionen auf.

Tab. 3-2: AS-Substitutionen der durch Mutagenese erzeugten Einfachmutanten der *H. c.* SAMT1 und 3

Mutante	Gewünschte Mutation	Zusätzliche Mutation
SAMT1 Leu216Met	216:Leu>Met	
SAMT1 Trp232Leu	232:Trp>Leu	
SAMT1 Phe357Thr	357:Phe>Thr	
SAMT3 Met156His	156: Met>His	273:Glu>Gly
SAMT3 Val231Ile	231:Val>Ile	
SAMT3 Val231Phe	231:Val>Phe	
SAMT3 Val321Phe	321:Val>Phe	
SAMT3 Val321Tyr	321:Val>Tyr	
SAMT3 Phe357Ser	357:Phe>Ser	

SAMT3 Phe357Tyr

357:Phe>Tyr

Drei der zehn Einfachmutanten wurden auf Grundlage der SAMT1 hergestellt, sieben besaßen als Ausgangssequenz die der SAMT3. In der Mutante der SAMT3 Met156His konnte eine weitere AS-Substitution nachgewiesen werden. An der Position 273 war statt Glutaminsäure ein Glycin zu finden. Diese AS lag im peripheren Bereich des Enzyms und hatte daher vermutlich keinen Einfluss auf die Umsetzung der Substrate.

Je nach der eingefügten Einfachmutation lagen den hergestellten Doppel- und Dreifachmutanten entweder die SAMT1- oder die SAMT3-Sequenz zugrunde. Die Tabelle 3-3 zeigt die Aminosäuresubstitutionen der hergestellten Doppel- und Dreifachmutanten.

Tab. 3-3: Aminosäuresubstitutionen der durch Mutagenese erzeugten Doppel- und Dreifachmutanten der *H. c.* SAMT1 und 3

Mutante	Gewünschte Mutation
SAMT1 Met156His+Leu216Met	156: Met>His, 216:Leu>Met
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu	216:Leu>Met, 232:Trp>Leu
SAMT1 Leu216Met+Phe357Thr	216:Leu>Met, 357:Phe>Thr
SAMT1 Met156His+Leu216Met+Trp232Leu	156: Met>His, 216:Leu>Met, 232:Trp>Leu
SAMT1 Met156His+Leu216Met+ Phe357Thr	156: Met>His, 216:Leu>Met, 357:Phe>Thr
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu+Phe357Thr	216:Leu>Met, 232:Trp>Leu, 357:Phe>Thr
SAMT3 Met156His+Trp232Leu	156: Met>His, 232:Trp>Leu
SAMT3 Met156His+Phe357Thr	156: Met>His, 357:Phe>Thr
SAMT3 Met156His+Trp232Leu+Phe357Thr	156:Met>His, 232:Trp>Leu, 357:Phe>Thr

3.3. Nachweis der Methylierungsaktivität hergestellter SAMT-Mutanten in der der Bakterienkultur

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob eine Mutation zu einem funktionsfähigen Protein führte, wurde die Produktbildung in der Bakterienkultur untersucht. Der SAMT3-Wildtyp diente als positive Kontrolle. Zunächst wurde der Vektor mit dem Fragment, welches für das jeweilige Protein kodierte, in BL21(DE3)pSBET-b Zellen transformiert. In der Hauptkultur wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Gleichzeitig wurden die Substrate SA und/oder BA in einer Endkonzentration von 1 mM dazugegeben. Während der Inkubation der Kulturen für ca. 20 Stunden konnten sich methylierte

Reaktionsprodukte akkumulieren. Diese wurden dann in Hexan extrahiert und im GC/MS vermessen.

Bei 15 der 18 untersuchten Kulturen konnten MSA und/oder MBA in der Hexanfraktion nachgewiesen werden. Die Abbildung 3-6 zeigt beispielhaft Ausschnitte der Chromatogramme der Hexanphase nach Zugabe von SA, BA sowie beiden Substraten im Fall der SAMT3-Mutante Phe357Tyr.

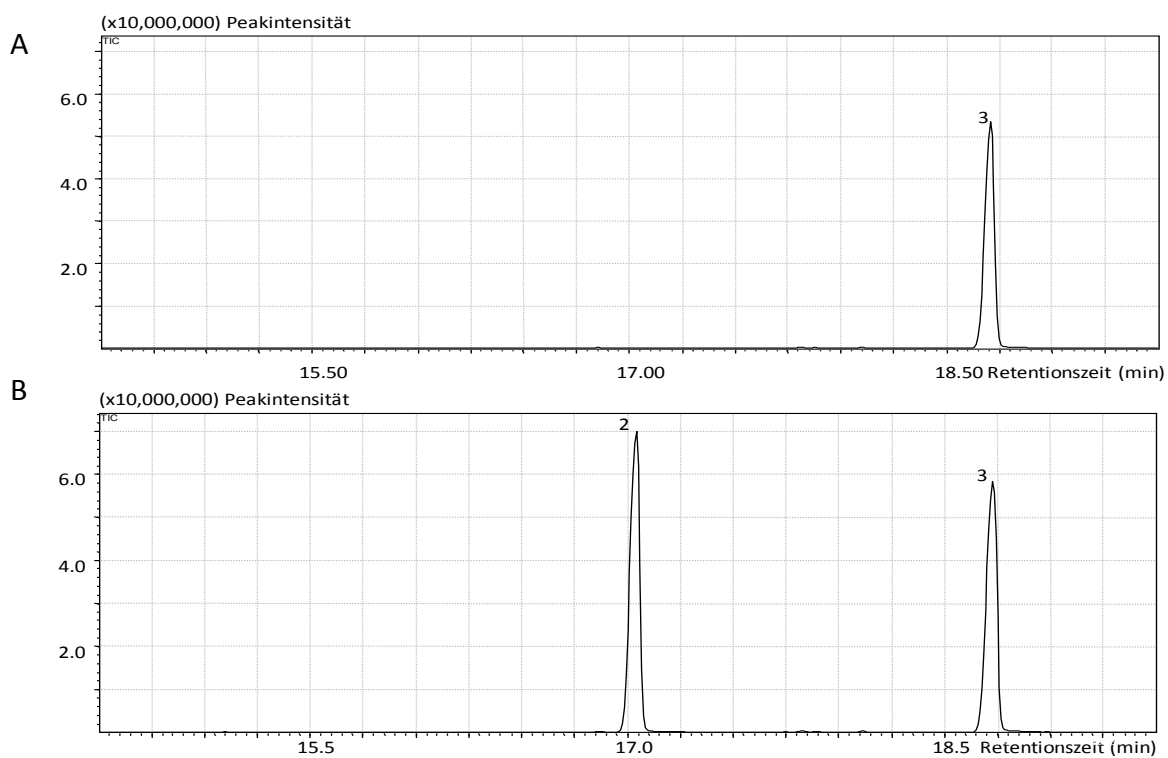
Bei einer Retentionszeit von ca. 15,4 min befand sich der MBA-Peak (Abb. 3-6, Peak 1), der von MSA lag bei ca. 17,2 min (Peak 2) und der Indol-Peak bei ca. 18,9 min (Peak 3). Indol diente als „interner Standard“, da Peakhöhe und Peakfläche in allen Proben ähnlich dimensioniert waren. Die Flächen der Produkt-Peaks wurden zur Fläche der jeweiligen Indol-Peaks ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise konnten die von den einzelnen Enzymen gebildeten Produkt-Mengen verglichen werden.

Im Ergebnis konnten in der Hexanphase der SAMT3-Mutanten Val231Ile und Phe357Tyr die größten Mengen an MSA und MBA nachgewiesen werden. Der SAMT3-Wildtyp und fünf weitere Mutanten produzierten mittlere Mengen (7-41 %) an MSA und MBA. Nur sehr geringe Produktmengen (< 2 %) konnten in den Mutanten SAMT3 Val321Tyr und SAMT1 Met156His+Leu216Met+Phe357Thr nachgewiesen werden (Tab. 3-4). In den Chromatogrammen von fünf Mutanten waren nur Spuren (< 1 %) an Produkten nachweisbar, wobei dies in drei Fällen nur MSA war.

Tab.3-4: Prozentuale Produktion (Peakfläche) von MSA und MBA im Vergleich zur Indolbildung (100 %) im Kulturüberstand der Wildtyp-SAMT3 und der SAMT1- und SAMT3-Mutanten (blau markierte Enzyme bevorzugten SA, rot markierte Enzyme bevorzugten BA) bei Zugabe von Einzelsubstraten (**SA, BA**) und simultaner Zugabe beider Substrate (**SA+BA**)

Substrate	SA oder BA		SA+BA	
	MSA	MBA	MSA	MBA
SAMT3 WT	43,4	7,1	36,4	0,8
SAMT3 Met156His	41,3	49,9	36,9	14,7
SAMT3 Val231Phe	46	14,9	42,7	0,7
SAMT3 Val231Ile	112,8	111,7	104,4	1,2
SAMT3 Val321Tyr	1,8	0,1	1,8	0,03

SAMT3 Phe357Ser	7,6	0,2	8,2	0,1
SAMT3 Phe357Tyr	112,1	65,7	112,2	1,7
SAMT1 Leu216Met	36,3	18,8	43,4	1,1
SAMT1 Met156His+Leu216Met	12,5	28	4,9	16,4
SAMT1 Met156His+Leu216Met+Phe357Thr	2,1	7,2	0,8	3,9



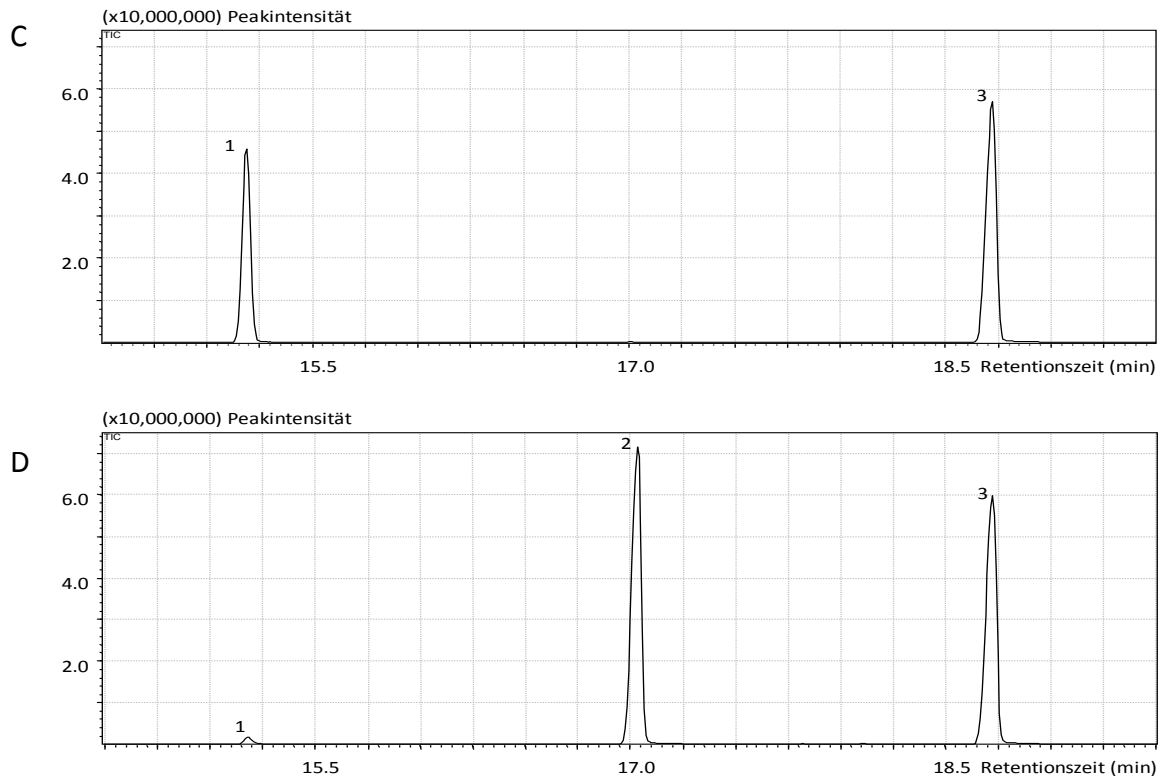


Abb. 3-6. Chromatogramme der Hexanphase ausgeschüttelter BL21(DE3)pSBET-b-Kulturen der überexprimierten SAMT3-Mutante Phe357Tyr .
A ohne Substrat **B** mit 1 mM Salizylsäure
C mit 1 mM Benzoesäure **D** mit je 1 mM Salizyl- und Benzoesäure
 1=Methylbenzoat 2=Methylsalizylat 3=Indol

Die Chromatogramme gaben nicht nur einen ersten Hinweis auf die Fähigkeit zur Methylierung von SA und BA. Die Einzelzugabe im Vergleich zur simultanen Zugabe beider Substrate zeigte ebenso, welches Substrat bevorzugt umgesetzt wurde. Alle in der Tabelle 3-4 blau unterlegten Enzyme zeigten dabei eine bevorzugte Nutzung von SA. Obwohl die Enzyme bei Einzelzugabe von BA teilweise sehr große Mengen an MBA produzierten, wurde bei Zugabe von SA und BA deutlich mehr MSA gebildet. Die Abbildung 3-7 soll dies grafisch an den Beispielen der SAMT3-Mutanten Met156His und Val231Ile verdeutlichen. Bei gleichzeitiger Zugabe der Substrate wurden nur noch 29,5 bzw. 1 % MBA im Vergleich zur alleinigen Zugabe von BA gebildet. Bei zwei der untersuchten Mutanten war jedoch ein anderes Verhalten zu beobachten. Die SAMT1-Doppel und -Dreifach-Mutanten Met156His+Leu216Met und Met156His+Leu216Met+Phe357Thr bildeten bei gleichzeitiger Zugabe von SA und BA bevorzugt MBA (Tab. 3-4, rot hinterlegt). Sie verhielten sich also eher

wie eine BSMT. Beide Mutanten besaßen AS-Substitutionen an den Positionen 156 und 216, was in diesen Untersuchungen als Voraussetzung zur Umwandlung der *H. c.* SAMT in eine BSMT auszureichen schien. Die Abbildung 3-8 zeigt die grafische Darstellung der Produktbildung der SAMT1-Doppelmutante Met156His+Leu216Met bei Einzelzugabe bzw. gleichzeitiger Zugabe von SA und BA in die Bakterienkultur.

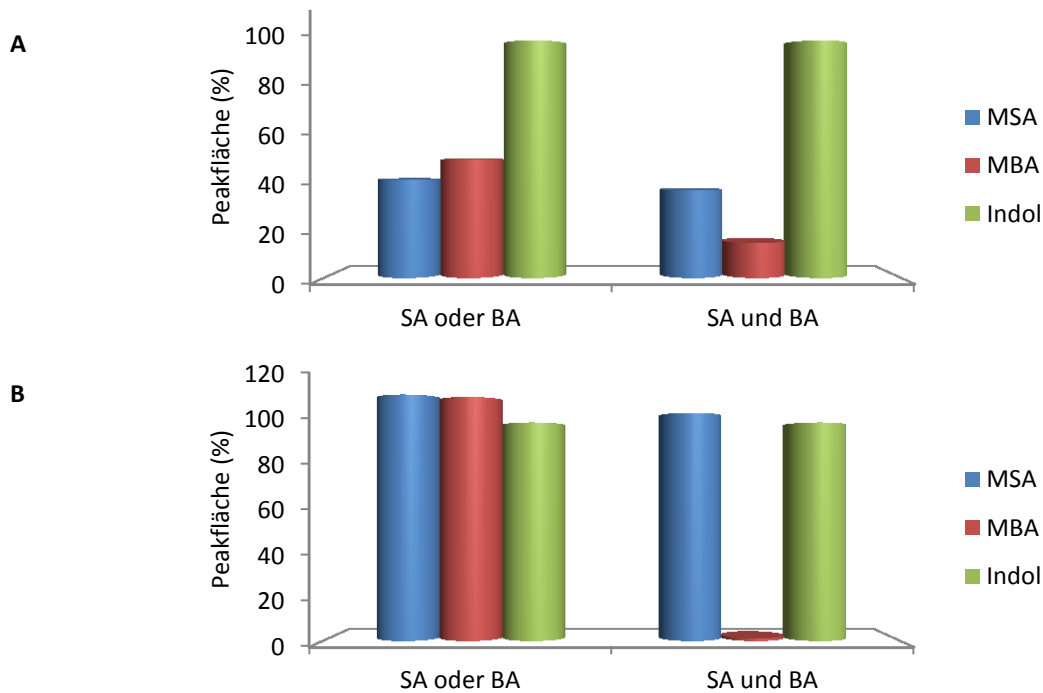
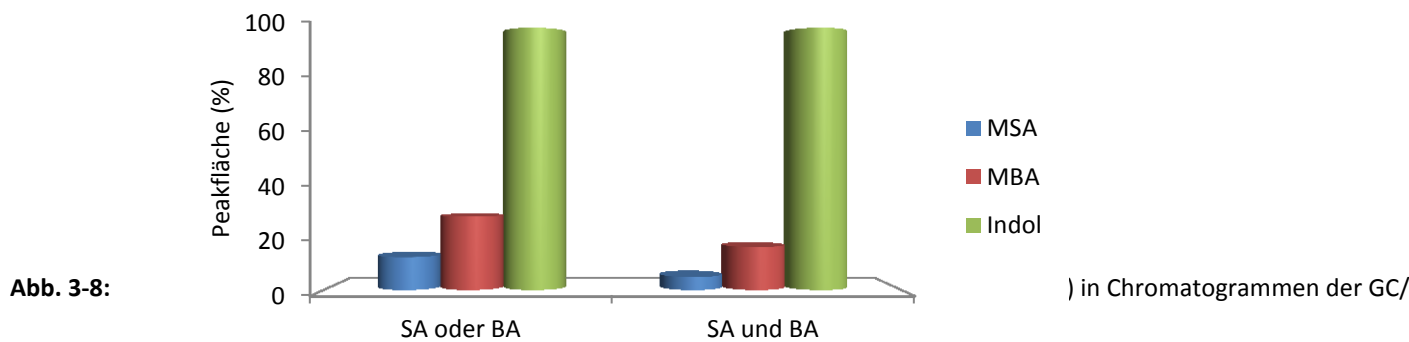


Abb. 3-7: Grafische Darstellung der Peakflächen von MSA und MBA relativ zu Indol (100 %) in Chromatogrammen der GC/MS-analysierten Hexanextrakte von Bakterienkulturen der SAMT3-Mutanten Met156His (**A**) und Val231Ile (**B**) nach Einzelzugabe und simultaner Zugabe von SA und BA.



Die

Ergebnisse der Untersuchungen zum Test der Methylierungsaktivität der in *E. coli* exprimierten Enzyme der *H. c.* SAMT sind in der Tabelle 3-5. zusammengefasst. Die Enzyme in grau wurden aufgrund ihrer fehlenden Aktivität in der Bakterienkultur in folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die SAMT1 und 3, sowie 14 Mutanten wurden für Expressionsstudien weiter verwendet.

Tab. 3-5: Übersicht über exprimierte SAMT-Enzyme, deren Aktivitäten mit SA und BA in der Bakterienkultur mittels GC/MS nachgewiesen wurden. Grau dargestellte Mutanten wurden bei nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt

– ohne Aktivität (+) Produkte nur in Spuren

+ < 10 % ++ 10-100 % +++ > 100 %

(% im Verhältnis zur Peakfläche des Indolpeaks)

Untersuchte Proteine der *H. c.* SAMT

**Nachweis
m.H.**

	GC/MS
SAMT1	n.d.
SAMT1 Leu216Met	++
SAMT1 Trp232Leu	-
SAMT1 Phe357Thr	(+)
SAMT1 Met156His+Leu216Met	++
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu	-
SAMT1 Leu216Met+Phe357Thr	(+)
SAMT1 Met156His+Leu216Met+Trp232Leu	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met+ Phe357Thr	+
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu+Phe357Thr	-
SAMT3	++
SAMT3 Met156His	++
SAMT3 Val231Ile	+++
SAMT3 Val231Phe	++
SAMT3 Val321Phe	(+)
SAMT3 Val321Tyr	+
SAMT3 Phe357Ser	+
SAMT3 Phe357Tyr	+++
SAMT3 Met156His+Trp232Leu	(+)
SAMT3 Met156His+Phe357Thr	(+)
SAMT3 Met156His+Trp232Leu+Phe357Thr	-

3.4. Überexpression rekombinanter Proteine

Die Expression der *H. c.* SAMT1/3 und ihrer Mutanten erfolgte in dem *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pSBET-b. Dieser enthielt zusätzlich zum transformierten Expressionsvektor das Helferplasmid pSBET-b. Der Vektor pSBET-b codierte für die Arginin-tRNA mit den Codons AGA und AGG, welche von *E. coli* kaum, von Pflanzen aber überwiegend genutzt werden (Schenk *et al.* 1995). Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Nach einer ca. 20-stündigen Inkubation bei 37°C und 200 rpm erfolgte die Zellernte, der Zellaufschluss und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine (Heidebrecht 2005). Die Wildtyp-Enzyme SAMT1 und SAMT3 sowie die Mutanten SAMT1 Leu216Met, Met156His+Leu216Met, Met156His+Leu216Met+Phe357Thr und SAMT3 Met156His, Val231Ile, Val231Phe, Val321Tyr konnten in ausreichender Menge in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen überexprimiert werden. Die Proteine wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend zu Aktivitätsbestimmungen im radioaktiven Assay genutzt. Die Abbildung 3-9 zeigt beispielhaft das Polyacrylamidgel der Reinigungsschritte der SAMT3-Mutante Val231Phe. Das rekombinante Protein hatte eine Länge von 400 AS, das einer Masse von 45 kDa entsprach, wovon 368 AS (41,4 kDa) die SAMT bildeten und 32 AS (3,6 kDa) verschiedene Schnittstellen, das V5-Epitop sowie den His-Tag enthielten.

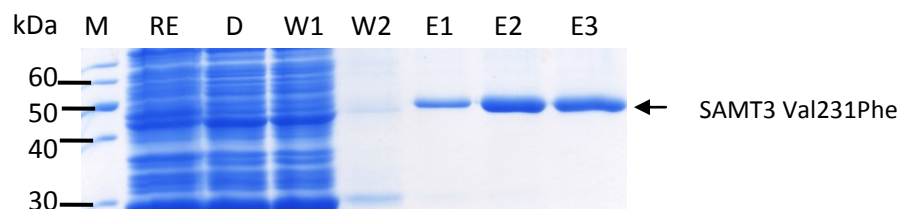


Abb. 3-9: PAA-Gel der Reinigungsschritte der rekombinanten *H. c.* SAMT3 Val231Phe durch Ni-NTA-Affinitätschromatografie

M	Marker (Page Ruler, unstained, Fermentas)
RE	Rohextrakt
D	Durchfluss
W1, 2	Waschfraktionen mit 40 mM (1) und 60 mM (2) Imidazol
E 1-3	Eluate mit 200 mM Imidazol

3.4.1. Testung der Expressionsbedingungen für den pET101/D-TOP0-Vektor und Proteinaufreinigung

Bei einigen Mutanten konnte nur ein sehr geringer Teil oder kein Protein in die lösliche Phase gebracht werden. Zur Optimierung der Bedingungen der Expression dieser Proteine wurde eine Test-Überexpression durchgeführt (2.2.13.1.). Dazu wurde der Expressionsvektor

zusätzlich in den Expressionsstamm HMS174 (DE3) transformiert und die Expression rekombinanter Proteine bei 20, 30 und 37°C getestet. Nach 2, 4, 6 und 20 Stunden erfolgte die Entnahme und Aufarbeitung einer 2 ml-Probe, um den Gehalt an rekombinanten Proteinen in der löslichen sowie unlöslichen Phase zu überprüfen. Die Überexpression im HMS174(DE3)-Stamm führte zu keiner Verbesserung der Löslichkeit. Daher wurden weitere Tests mit den Mutanten in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen durchgeführt. Jedoch konnte bei einer Inkubation bei 20°C kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden. Bei einer Inkubation der Hauptkultur bei 30 bzw. 37°C wurde rekombinantes Protein nachgewiesen. Die Gelbilder in Abb. 3-10 zeigen am Beispiel der Doppelmutante SAMT1 Leu216Met+Phe357Thr die im Pellet und Überstand enthaltenen Proteine. Als Negativkontrolle diente die nicht induzierte Kultur. Nach der Induktion wurden nach 2, 4, 6 und 20 h Proben entnommen, aufgearbeitet und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Westernblot wurden mit Hilfe von Anti-His-Antikörpern die rekombinanten Proteine detektiert und visualisiert. Als Positivkontrolle wurde auf jedes Gel ebenfalls der Wildtyp *H. c.* SAMT3 aufgetragen. Gel und Blot zeigten, dass in dieser Mutante bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bereits nach 3 h rekombinantes Protein nachgewiesen werden konnte. Dieses lag jedoch ungelöst im Pellet vor. Eine Verringerung der Temperatur auf 30°C führte dazu, dass kein rekombinantes Protein mehr synthetisiert wurde.

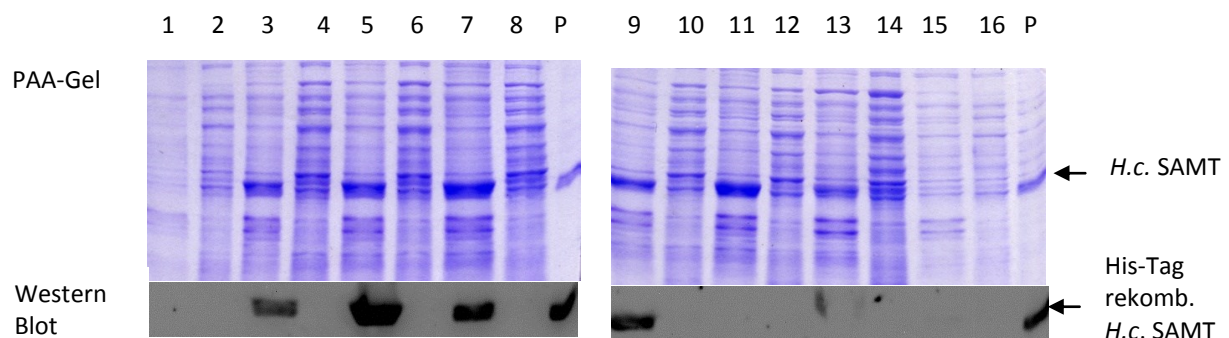


Abb. 3-10: PAA-Gel der löslichen und unlöslichen Protein-Fractionen nach Optimierung der Überexpression der SAMT1-Mutante Leu216Met+Phe357Thr in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen. Mit Anti-His-AK erfolgte der Nachweis rekombinanter Proteine (Western Blot).

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Pellet, nicht induziert | 9 Pellet, 20 h, 37°C |
| 2 Überstand, nicht induziert | 10 Überstand, 20 h, 37°C |
| 3 Pellet, 2h, 37°C | 11 Pellet, nicht induziert, 30°C |
| 4 Überstand, 2h, 37°C | 12 Überstand, nicht induziert, 30°C |
| 5 Pellet, 4 h, 37°C | 13 Pellet, 2 h, 30°C |
| 6 Überstand, 4 h, 37°C | 14 Überstand, 2 h, 30°C |
| 7 Pellet, 6 h, 37°C | 15 Pellet, 4 h, 30°C |
| 8 Überstand, 6 h, 37°C | 16 Überstand, 4 h, 30°C |
| P <i>H. c.</i> SAMT3 | |

Die Tabelle 3-6 zeigt die Mutanten, deren Überexpressionsbedingungen in einer Reihe von Überexpressionen unter verschiedenen Bedingungen getestet wurden und in eine Proteinsynthese mündeten. Die Ergebnisse geben Aufschluss über die Bildung des rekombinanten Proteins in BL21(DE3)pSBET-b Zellen, welches in diesen Fällen vorrangig ungelöst im Pellet vorlag. Nur in den Mutanten SAMT1 Trp232Leu und SAMT3 Met156His+Trp232Leu konnten geringe Enzymmengen in der löslichen Phase nachgewiesen werden. Bei drei Mutanten konnte weder eine Expression löslicher noch unlöslicher Proteine erreicht werden.

Tab. 3-6: Expression der rekombinanten Proteine verschiedener Mutanten der *H. c.* SAMT nach Optimierung der Überexpressions-Bedingungen

Mutante	Rekombinantes Protein
SAMT1 Trp232Leu	gering im Überstand, bei 37 °C nach 4 h im Pellet
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu	bei 37 °C nach 2 h im Pellet
SAMT1 Leu216Met+ Phe357Thr	bei 37 °C nach 2 h im Pellet
SAMT3 Met156His+ Trp232Leu	gering im Überstand, bei 30 °C im Pellet
SAMT3 Met156His+ Phe357Thr	bei 37 °C nach 2 h im Pellet
SAMT3 Met156His+ Trp232Leu+ Phe357Thr	bei 30 °C nach 2 h im Pellet

Die Ergebnisse der Optimierungen der Expressionsbedingungen und der Überexpression der *H. c.* SAMT in *E. coli* BL21(DE3)pSBET-b-Zellen sind in der Tabelle 3-7 zusammengefasst. Die in grau dargestellten Enzyme wurden für nachfolgende Untersuchungen nicht herangezogen, da es nicht oder in zu geringem Umfang gelang, rekombinantes Protein in der löslichen Phase zu exprimieren. Zusätzlich zu den Wildtyp-Enzymen verblieben neun Mutanten der *H. c.* SAMT zur Untersuchung der Substratspektren und der Enzymkinetik.

Tab. 3-7: Übersicht über SAMT-Enzyme, die erfolgreich in BL21(DE3)pSBET-b Zellen exprimiert werden konnten. Grau dargestellte Mutanten wurden bei nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

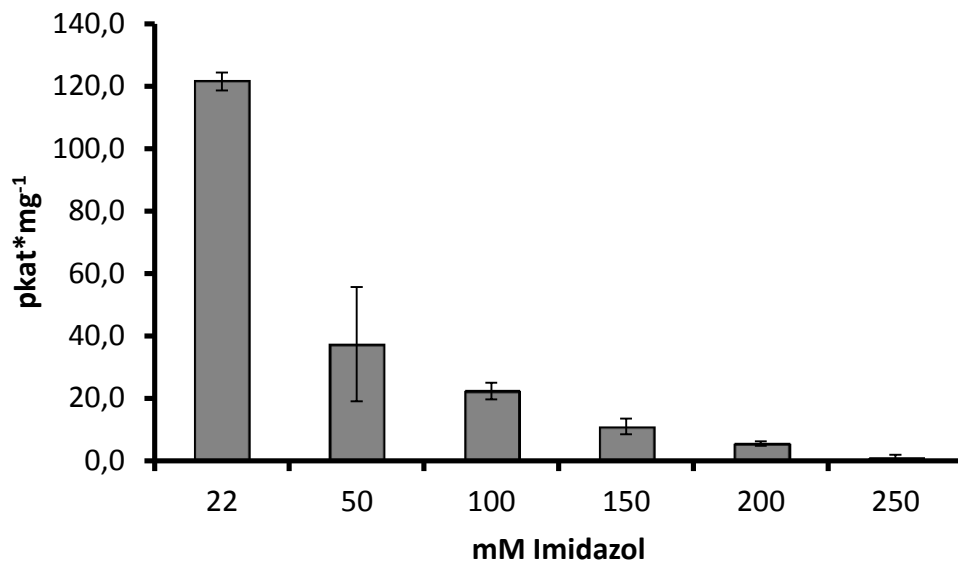
GC/MS: – ohne Aktivität **(+)** Produkte nur in Spuren
 + < 10 % ++ 10-100 % +++ > 100 % (% im Verhältnis zur Indolmenge)
Überexpression: – kein lösliches Protein **(+)** Protein nur in Spuren
 + bis +++ wenig bis viel Protein nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Untersuchte Proteine der <i>H. c.</i> SAMT	Nachweis m.H. GC/MS	Über- expression
SAMT1	n.d.	+++
SAMT1 Leu216Met	++	+++
SAMT1 Trp232Leu	-	(+)
SAMT1 Phe357Thr	(+)	(+)
SAMT1 Met156His+Leu216Met	++	+++
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu	-	-
SAMT1 Leu216Met+Phe357Thr	+	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met+Trp232Leu	-	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met+ Phe357Thr	+	+++
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu+Phe357Thr	-	-
SAMT3	++	+++
SAMT3 Met156His	++	+++
SAMT3 Val231Ile	+++	+++
SAMT3 Val231Phe	++	+++
SAMT3 Val321Phe	+	-

SAMT3 Val321Tyr	+	+
SAMT3 Phe357Ser	+	++
SAMT3 Phe357Tyr	+++	+++
SAMT3 Met156His+Trp232Leu	(+)	(+)
SAMT3 Met156His+Phe357Thr	(+)	-
SAMT3 Met156His+Trp232Leu+Phe357Thr	-	-

3.5. Optimierung des radioaktiven Enzym-Assays zur Bestimmung der Aktivität rekombinanter Proteine

Zur Bestimmung der Substratspektren sowie enzymkinetischer Parameter wurde der radioaktive Enzym-Aktivitätstest, wie bei Heidebrecht 2005 beschrieben, durchgeführt (2.2.24.). Dazu wurde aufgereinigtes Protein mit ^{14}C -markiertem SAM und nicht markiertem



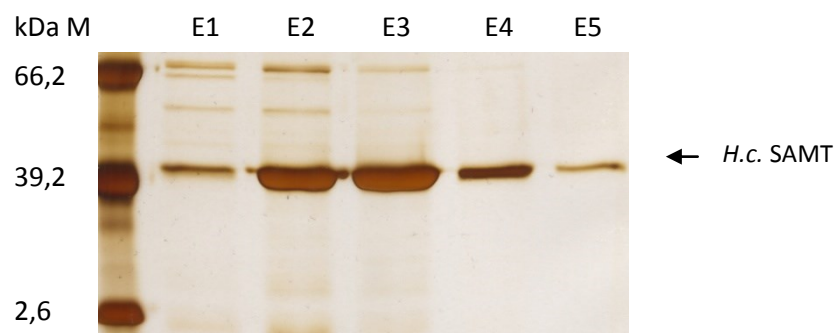
Substrat inkubiert (Abb. 2-1). In vorangegangenen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass bei hohen Enzymkonzentrationen eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität stattfand (Heidebrecht 2005). Auch war ein negativer Einfluss des Imidazols, als potentieller Partner für Wasserstoffbrückenbindungen, auf die Aktivität möglich. Daher wurde der Einfluss der Imidazolkonzentration sowie der Proteinkonzentration auf die Aktivität der Enzyme untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.

3.5.1. Imidazolkonzentration

Um den Einfluss der Imidazolkonzentration auf die Aktivität der SAMT zu untersuchen, wurden dem Enzym im Aktivitätstest unterschiedliche Endkonzentrationen an Imidazol zugesetzt und der Substratumsatz bestimmt. Die Abbildung 3-11 zeigt die Aktivität eines Eluates der Wildtyp SAMT3 mit SA ohne Imidazol-Zusatz sowie mit 50, 100, 150, 200 und 250 mM Imidazol. Die Endkonzentrationen im Enzymsatz ohne zusätzliche Zugabe von Imidazol lagen zwischen 12 und 35 mM (im Mittel 22 mM), je nach dem eingesetzten Volumen an eluiertem Protein (0,5-1,25 mg). Bei Eluaten mit geringer Proteinkonzentration und daraus resultierenden größeren, benötigten Volumina im Enzymtest konnte die Konzentration an Imidazol jedoch wesentlich größer sein. Wie in der Grafik zu sehen, bewirkte bereits eine Imidazolkonzentration von 50 mM einen Aktivitätsverlust von ca. 70 % ($37,3 \pm 18 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). Mit 22 mM Imidazol lag die Aktivität bei $121,5 \pm 2,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$. Mit 100 mM Imidazol sank die Aktivität auf ca. 18 % ($22,3 \pm 2,5 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) und bei Konzentrationen ab 150 mM Imidazol fiel die spezifische Aktivität mit SA unter 10 % im Vergleich zum Ausgangswert ($11 \pm 2,5 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ und darunter).

Abb.3-11: Enzymaktivität der *H. c.* SAMT3 mit SA in Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration (n=2)

Es zeigte sich, dass Imidazol mit steigender Konzentration die Aktivität des Enzyms beeinträchtigte. Daher war es sinnvoll, die Konzentration an Imidazol bei der Elution der rekombinanten Proteine von der Ni-NTA-Säule so gering wie möglich zu wählen. Ein Elutionstest mit steigenden Imidazolkonzentrationen zeigte, dass bereits 200 mM Imidazol ausreichten, um das Protein von der Säule zu eluieren (Abb. 3-12). Bei sehr hohen Imidazolkonzentrationen ist eine Umpufferung durch Dialyse möglich bzw. eine Entfernung des imidazolhaltigen Puffers durch Ultrazentrifugation mit anschließender Resuspendierung des Proteins in neuem Puffer.

**Abb. 3-12:** SDS-Gel der SAMT-Elutionsfraktionen (Ni-NTA) mit steigender Imidazolkonzentration (Silberfärbung).

M	Premixed protein molecular weight marker, low range (Roche)
E1	Elutionspuffer mit 150 mM Imidazol, 500 µl
E2	Elutionspuffer mit 200 mM Imidazol, 500 µl
E3	Elutionspuffer mit 225 mM Imidazol, 500 µl
E4,5	Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol, 500 µl

3.5.2. Enzymkonzentration

Da bei geringen Enzymaktivitäten eine Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge messbare Umsätze ermöglichte, war zu überprüfen, wie sich der Substratumsatz der SAMT in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verhält. Die Grafik zeigt die Produktion von MSA durch 0,5, 0,75, 1,0 und 1,25 mg rekombinantes SAMT3-Protein. Dabei war eine lineare Zunahme der Produktmenge zu erkennen. Wurde die Produktmenge auf die eingesetzte Enzymmenge zurückgerechnet, wurden vergleichbare Mengen an MSA gebildet, d. h. die spezifische Aktivität blieb gleich. Daraus folgte, dass eine steigende Enzymkonzentration keinen Effekt auf die Enzymaktivität hatte.

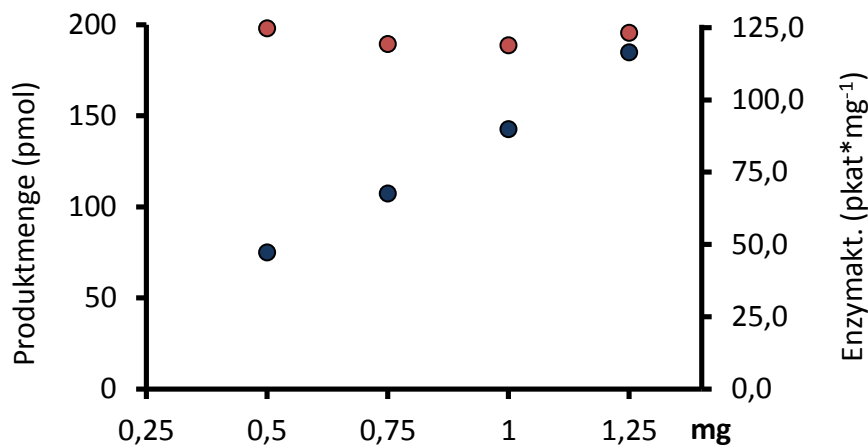


Abb. 3-13: Produktbildung (pmol MSA, blau) und Enzymaktivität (pkat*mg⁻¹, rot) der *H. c.* SAMT3 in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge je Ansatz im radioaktiven Enzymassay (n=1)

3.6. Substratspektren der *H. c.* SAMT und ihrer Mutanten

Zur Bestimmung der Substratspektren der *H. c.* SAMT wurden insgesamt 18 verschiedene Substrate getestet (Abb. 2-1). Neben der BA und ihren unterschiedlich hydroxylierten und methylierten Derivaten wurden Zimtsäure und Hydroxyzimtsäuren, Nicotin-, Jasmon- und Anthranilsäure getestet. Diese Substrate wurden aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur und ihrer Nutzung durch andere, sehr ähnliche Mitglieder der SABATH-MT-Familie ausgewählt.

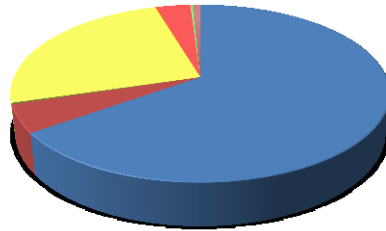
3.6.1. Substratspektren der Wildtypenzyme SAMT1 und 3

In dieser Arbeit wurden die Substratspektren der Wildtyp-Enzyme SAMT1 und SAMT3 bestimmt. Die Sequenzen beider Proteine wiesen nur einen einzigen Unterschied in der AS-Sequenz auf. An der Position 215 besaß die SAMT1 eine Phenylalanin, die SAMT3 dagegen eine Isoleucin. Obwohl diese Aminosäuren nicht im aktiven Zentrum lagen, konnten leichte Unterschiede in den Substratspektren der Enzyme nachgewiesen werden.

SAMT1

Die *H. c.* SAMT1 setzte acht Substrate in nachweisbaren Mengen um. Dabei wurde SA mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität von 404 pkat*mg⁻¹ umgesetzt. Mit allen anderen Substraten zeigte das Enzym deutlich geringere Aktivitäten. So wurde nur 2,3-Dihydroxy-BA (155,4 pkat*mg⁻¹) mit einer relativen Aktivität von mehr als 10 % umgesetzt. Die relativen Aktivitäten mit BA, 2,5-Dihydroxy-BA und Anthranilsäure lagen bei je 7,8; 5,3 und 1,2 % im

Vergleich zur SA. 3-Hydroxy-, 2,4- und 2,6-Dihydroxy-BA wurden mit einer relativen Aktivität von < 1 % umgesetzt.



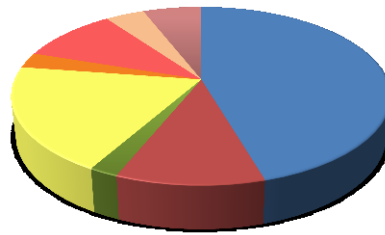
Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	404,9 ± 68	100
Benzoessäure	31,6 ± 10,7	7,8 ± 2,6
3-Hydroxy-Benzoessäure	1,5 ± 1	0,4 ± 0,3
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	155,4 ± 25,8	38,4 ± 6,4
2,4-Dihydroxy-Benzoessäure	0,8 ± 1	0,2 ± 0,3
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	21,5 ± 7,4	5,3 ± 1,8
2,6-Dihydroxy-Benzoessäure	1,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Anthranilsäure	4,9 ± 5,5	1,2 ± 1,4

Abb. 3-14: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1 umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 404,9 pkat*mg⁻¹). 2 x durchgeführt

Der Zugang zum aktiven Zentrum der SAMT1 wurde durch Substitutionen in *meta*- und *para*-Stellung stark behindert, nur die doppelte Hydroxylierung in *meta*- und *para*-Position ermöglichte eine gute Umsetzbarkeit. Eine Methoxy-Gruppe sowie die Hydroxy-Gruppe in *para*-Stellung verhindern die Umsetzung vollständig. Die Abbildung 3-14 zeigt die spezifischen und relativen Aktivitäten der SAMT1 mit den umsetzbaren Substraten.

SAMT3

Die *H. c.* SAMT3 war in der Lage, acht verschiedene Substrate in nachweisbaren Mengen umzusetzen. Die in *E. coli* von diesem Enzym umgesetzte SA bestätigte sich als Substrat, welches auch im Enzymassay am besten umgesetzt wurde. Die spezifische Aktivität für dieses Substrat betrug durchschnittlich 257 pkat*min⁻¹ (Abb. 3-15).



Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	257,0 ± 11,6	100
Benzoessäure	60,5 ± 14,3	23,4 ± 4,5
3-Hydroxy-Benzoessäure	11,9 ± 6,8	4,6 ± 2,4
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	107,93 ± 58,6	41,5 ± 20,9
2,4-Dihydroxy-Benzoessäure	15,9 ± 12,6	6,1 ± 4,1
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	56,1 ± 12,6	21,8 ± 3,9
2-Methoxy-Benzoessäure	22,5 ± 21,9	9,0 ± 8,9
Anthranilsäure	33,6 ± 15,5	12,9 ± 5,5

Abb. 3-15: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3 umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 257 pkat*mg⁻¹). 2 x durchgeführt

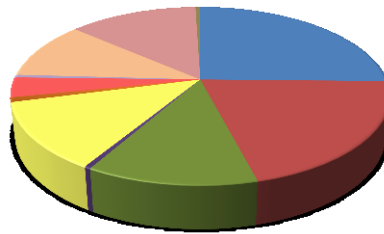
Neben der 2-Hydroxy-BA (SA) wurden auch dieser strukturell sehr ähnliche Substrate methyliert. So stellten BA, 3-Hydroxy-BA, 2,3-, 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA sowie 2-Methoxy-BA und Anthranilsäure nutzbare Substrate dar. Die spezifischen Aktivitäten des Enzyms mit diesen Substanzen lagen zwischen 4 und 42 % im Vergleich zur Aktivität mit SA. BA wurde mit einer spezifischen Aktivität von 60,5 pkat*min⁻¹ mit 24 % der maximalen Aktivität umgesetzt. War BA in *meta*-Position mit einer Hydroxylgruppe versehen, wurde das Substrat nur noch zu 4,6 % umgesetzt, eine Hydroxylgruppe in *para*-Stellung verhinderte den Umsatz völlig. Eine zusätzliche Methylierung in *ortho*-Stellung schien die negativen Effekte abzumildern: 2,3-Dihydroxy-BA wurde zu 41,5 % und 2,4-Dihydroxy-BA zu 6,1 % umgesetzt. Die Hydroxylgruppen in 2,6-; 3,4- und 3,5-Dihydroxy-BA verhinderten eine Umsetzung durch die SAMT3. Ein Austausch der Hydroxylgruppe in *ortho*-Stellung der BA gegen eine Aminogruppe (Anthranilsäure) oder eine Methoxygruppe (2-Methoxy-BA) führte zu einer

deutlichen Verringerung der Aktivität (je 12,9 und 9 %). Besaß das Substrat einen Pyridin- (Nicotinsäure) statt eines Benzolrings, war eine Umsetzung nicht möglich. Die Tabelle 3-9 zeigt die spezifischen und relativen Aktivitäten der SAMT 3 mit den umsetzbaren Substraten.

3.6.2. Substratspektren der SAMT-Mutanten

SAMT3 Met156His

Das hydrophobe Methionin an der Position 156 der SAMT3 wurde durch das basische Histidin ersetzt. Die Met156His-Mutante der SAMT3 wies die höchste spezifische Aktivität mit SA auf, wobei diese mit $109,3 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ im Vergleich zur SAMT3 ($257 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) ca. um die Hälfte verringert war (Abb. 3-16).



Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	109,3 ± 45,8	100
Benzoessäure	89,2 ± 31,0	83,0 ± 6,4
3-Hydroxy-Benzoessäure	53,3 ± 34,8	46,2 ± 12,5
4-Hydroxy-Benzoessäure	2,0 ± 2,2	1,6 ± 1,4
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	52,8 ± 35,7	45,5 ± 13,6
2,4-Dihydroxy-Benzoessäure	3,6 ± 4,3	2,70 ± 2,8
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	15,5 ± 16,5	12,1 ± 10,0
3,5-Dihydroxybenzoessäure	2,2 ± 2,7	1,7 ± 1,8
2-Methoxy-Benzoessäure	45,3 ± 46,3	35,8 ± 27,3
Anthranilsäure	56,8 ± 54,7	45,5 ± 31,0
Nicotinsäure	2,1 ± 2,1	1,7 ± 1,2

Abb. 3-16: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Met156His umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die

relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen ($100\% = 109,3 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). 2 x durchgeführt

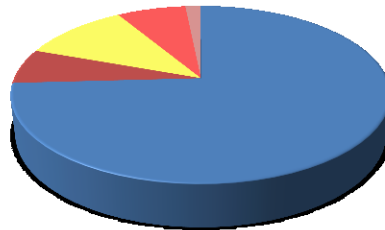
Die spezifische Aktivität mit BA ($89,2 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) hatte sich im Vergleich zum Wildtyp ($60,5 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) um ca. 50 % gesteigert. Mit 3-Hydroxy-BA zeigte die Mutante eine ca. fünffach bessere Aktivität (Mutante: $53,3 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$, SAMT3: $11,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) und die spezifische Aktivität mit 2-Methoxy-BA verdoppelte sich (Mutante: $45,3 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$, SAMT3: $22,5 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). Die Mutante mit der Substitution an der Position 156 zeigte im Vergleich zur SAMT3 eine Vergrößerung des Substratspektrums. Sie war zusätzlich in der Lage, 4-Hydroxy-BA ($2,8 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$), 3,5-Dihydroxy-BA ($3,1 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) und Nicotinsäure ($2,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) umzusetzen. Die Aktivitäten waren gering, jedoch deutlich von der Negativkontrolle abzugrenzen. Die absoluten Aktivitäten mit den einzelnen Substraten zeigten, dass sich eine *ortho*-Hydroxylierung negativ auf die Umsetzung durch die Met156His-Mutante auswirkte. Dies wurde neben der halbierten Aktivität mit SA auch durch die deutlich verringerten Umsätze von 2,3-; 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA deutlich.

Zusammenfassend konnte herausgestellt werden, dass die SAMT3-Mutante Met156His wesentlich schlechter SA methylierte als die SAMT3. Die Methylierung von BA, 3-Hydroxy-BA, 2-Methoxy-BA und Anthranilsäure wurde besser und 4-Hydroxy-BA, 3,5-Dihydroxy-BA und Nikotinsäure wurden zusätzlich umgesetzt (Abb. 3-16).

SAMT1 Leu216Met

Durch den Austausch von Leucin gegen Methionin an der Position 216 der SAMT1 blieben die chemischen Eigenschaften unverändert, da es sich bei beiden um aliphatische, neutrale und unpolare AS handelt. Im Ergebnis führte der Austausch zu einer Verkleinerung des Substratspektrums. Diese Mutante war nicht mehr in der Lage 3-Hydroxy-BA, 2,4-Dihydroxy-BA und 2,6-Dihydroxy-BA umzusetzen (Abb. 3-17). Diese drei Substrate wurden vom SAMT1-Wildtyp zwar sehr schlecht, aber von der Negativkontrolle deutlich absetzbar, mit einer relativen Aktivität von $>1\%$, umgesetzt (Abb. 3-14). Die SAMT1-Mutante Leu216Met setzte SA mit einer spezifischen Aktivität von $280,5 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ mit ca. 70 %-iger Effizienz im Vergleich zur SAMT1 ($404,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) um. Verglichen mit der SAMT1 wurden neben SA ebenso BA (77 %) und 2,3-Dihydroxy-BA (27 %) in geringerem Umfang umgesetzt. Eine leichte Steigerung der spezifischen und relativen Aktivität war mit den Substraten 2,5-Dihydroxy-BA und Anthranilsäure nachzuweisen.

Die Mutante Leu216Met wies eine verringerte spezifische Aktivität mit SA im Vergleich zur SAMT1 auf. Das Substratspektrum war um die Substrate 3-Hydroxy-BA, 2,4- und 2,6-Dihydroxy-BA verkleinert.



Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	280,5 ± 85,0	100
Benzoessäure	24,2 ± 6,1	8,7 ± 0,4
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	41,2 (n = 1)	12,1
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	26,5 (n = 1)	7,8
Anthranilsäure	6,0 ± 2,2	2,4 ± 1,5

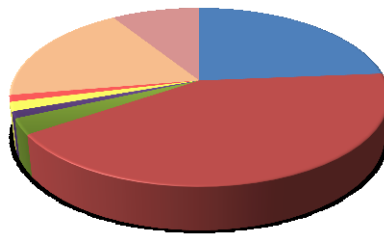
Abb. 3-17: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1-Mutante Leu216Met umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 280,5 pkat*mg⁻¹). 2 x durchgeführt

SAMT1 Met156His+Leu216Met

Die Doppelmutante der SAMT1 Met156His+Leu216Met zeigte im Vergleich zu allen anderen Mutanten die größte spezifische Aktivität mit BA (Abb. 3-18). Diese war fast dreifach höher als in der SAMT1 (Mutante: 83,4 pkat*mg⁻¹, SAMT1: 31,6 pkat*mg⁻¹). Die spezifische Aktivität mit SA verringerte sich um ca. 90 % (Mutante: 47,3 pkat*mg⁻¹, SAMT1: 404,9 pkat*mg⁻¹). Die spezifischen Aktivitäten mit 2,3- und 2,5-Dihydroxy-BA waren deutlich geringer als im Wildtyp. Sie verringerten sich von 155,4 pkat*mg⁻¹ (2,3-Dihydroxy-BA) und 21,5 pkat*mg⁻¹ (2,5-Dihydroxy-BA) um ein Vielfaches auf 3,3 bzw. 2,4 pkat*mg⁻¹. Die von der SAMT1 in geringem Umfang umgesetzten Substrate 2,4- und 2,6-Dihydroxy-BA führten in der Mutante zu keiner nachweisbaren Produktbildung. Eine deutliche Steigerung der

Methylierungsaktivität konnte mit Anthranilsäure erreicht werden. Zusätzlich war das Enzym in der Lage, 2-Methoxy-BA umzusetzen (Abb. 3-18).

Die SAMT1-Doppelmutante zeichnete sich durch eine maximale spezifische Aktivität mit BA aus. War diese in *ortho*-Stellung mit einer Hydroxylgruppe versehen, verschlechterte sich die Aktivität deutlich. War das Substrat in *ortho*-Stellung mit einer weniger polaren funktionellen Gruppe substituiert, so bei 2-Methoxy-BA und Anthranilsäure, verbesserte sich die Methylierungsaktivität. In der Mutante wirkte sich eine Hydroxylierung allein in *meta*- und *para*-Position nicht so störend aus wie in der SAMT1.



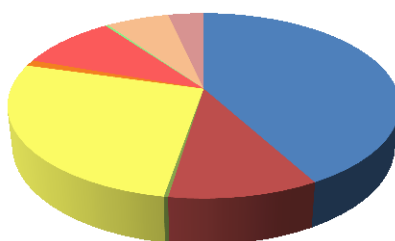
Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	47,3 ± 6,3	100
Benzoessäure	83,4 ± 6,8	209,3 ± 46,9
3-Hydroxy-Benzoessäure	5,7 ± 2,1	13,7 ± 6,9
4-Hydroxy-Benzoessäure	2,4 ± 0,01	5,7 ± 0,8
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	3,3 ± 0,9	7,7 ± 1,1
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	2,4 ± 0,6	6,7 ± 2,4
2-Methoxybenzoessäure	37,2 ± 2,9	87,3 ± 6,0
Anthranilsäure	17,9 ± 5,6	41,3 ± 6,9

Abb. 3-18: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT1-Mutante Met156His+Leu216Met umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 47,3 pkat*mg⁻¹). 2 x durchgeführt

SAMT3 Val231Ile

Die Substitution von Valin an der Position 231 gegen Isoleucin, beides hydrophobe AS, bewirkte im Substratspektrum der SAMT3 kaum Veränderungen. Die 3-Hydroxy-BA und 2,6-

Dihydroxy-BA wurden von der Mutante mit einer relativen Aktivität von <1 % umgesetzt (Abb. 3-19). Die spezifischen Aktivitäten mit SA, BA und 2,3-Dihydroxy-BA waren jedoch deutlich höher als in der SAMT3. Die Mutante wies eine um ca. 60 % höhere Aktivität mit SA (Mutante: 414,6 pkat*mg⁻¹; SAMT3: 257 pkat*mg⁻¹) und eine um ca. 70 % höhere Aktivität mit BA (Mutante: 103,1 pkat*mg⁻¹; SAMT3: 60,3 pkat*mg⁻¹) auf. Die Aktivität mit 2,3-Dihydroxy-BA hatte sich um das 2,5-fache erhöht (Mutante: 263,5 pkat*mg⁻¹, SAMT3: 107,9 pkat*mg⁻¹). Auch die Substrate 2,5-Dihydroxy-BA und 2-Methoxy-BA wurden von dieser Mutante besser methyliert. Die zusätzliche Methylierung von 2,6-Dihydroxy-BA sowie die bessere Umsetzung in *ortho*-Position substituierter BA-Derivate wiesen darauf hin, dass eine funktionelle Gruppe an dieser Stelle eine Umsetzung weniger behinderte als in der SAMT3.



Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	414,6 ± 75,7	100
Benzoessäure	103,1 ± 11,0	25,0 ± 1,9
3-Hydroxy-Benzoessäure	2,9 ± 0,9	0,7 ± 0,1
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	263,5 ± 8,9	64,8 ± 13,9
2,4-Dihydroxy-Benzoessäure	10,4 ± 6,4	2,4 ± 1,1
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	94,7 ± 8,9	23,0 ± 2,1
2,6-Dihydroxy-Benzoessäure	2,6 ± 0,7	0,6 ± 0,1
2-Methoxy-Benzoessäure	61,2 ± 6,9	14,9 ± 1,0
Anthranilsäure	34,7 ± 10,6	8,3 ± 1,0

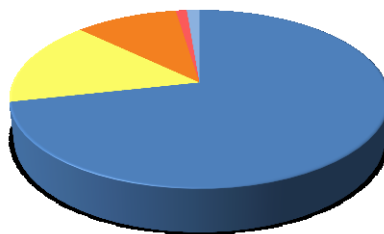
Abb. 3-19: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Val231Ile umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 414,6 pkat*mg⁻¹). 2 x durchgeführt

Die SAMT3-Mutante Val231Ile zeigte im Vergleich zur SAMT3 mit allen nutzbaren Substraten eine erhöhte spezifische Aktivität, die Aktivität mit SA lag beim 1,6- mit BA beim 1,7-fachen. Zusätzlich konnte 2,6-Dihydroxy-BA umgesetzt werden.

SAMT3 Val231Phe

Bei der SAMT3-Mutante Val231Phe wurde das kleine, hydrophobe Valin durch das große, hydrophobe Phenylalanin ersetzt. Dies führte zur deutlichen Verringerung der spezifischen Aktivitäten mit den umgesetzten Substraten. So lag die Aktivität mit SA im Vergleich zur SAMT3 nur noch bei ca. 65 % (Mutante: $165,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$, SAMT3: $257 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Abb. 3-20). Das Substratspektrum dieser Mutante war deutlich kleiner. BA, 3-Hydroxy-BA, 2-Methoxy-BA und Anthranilsäure konnten nicht mehr umgesetzt werden. Eine Hydroxylgruppe in *ortho*-Stellung schien Bedingung für eine Methylierung durch diese Mutante zu sein, da SA sowie 2,3-, 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA umgesetzt werden konnten. Auch die Aminogruppe von Anthranilsäure verhinderte eine Umsetzung. Allerdings ermöglichte die AS-Substitution die zusätzliche Methylierung von Zimtsäure.

Die SAMT3-Mutante Val231Phe wies ein deutlich kleineres Substratspektrum als die SAMT3 auf. Sie war nicht in der Lage BA umzusetzen, nutzte jedoch Zimtsäure als Substrat.



Substrat	Spezifische Aktivität [pkat*mg ⁻¹]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	165,9 ± 98,7	100
2,3-Dihydroxy-Benzoesäure	36,2 ± 11,7	23,9 ± 7,2
2,4-Dihydroxy-Benzoesäure	24,2 ± 9,0	15,8 ± 4,0
2,5-Dihydroxy-Benzoesäure	2,6 ± 1,0	1,7 ± 0,4
Zimtsäure	3,0 ± 1,5	1,9 ± 0,3

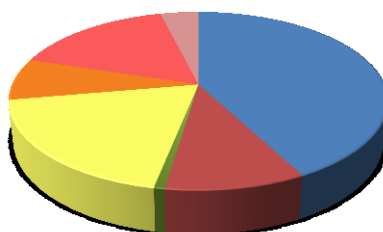
Abb 3-20: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Val231Phe umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die

relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen (100 % = 165,9 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$).
2 x durchgeführt

SAMT3 Phe357Tyr

Das in allen SAMT-Enzymen hoch konservierte Phenylalanin wurde bei der SAMT3-Mutante Phe357Tyr durch ein polares Tyrosin ersetzt. In Folge dessen verringerte sich die Fähigkeit der Mutante, SA umzusetzen nur minimal (Mutante: 221,1 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$; SAMT3: 257 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Abb. 3-21). Die relativen Aktivitäten der Mutante mit 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA waren im Vergleich zur SAMT3 etwas höher, wobei sich die absoluten Werte im Fall von 2,4-Dihydroxy-BA mehr als verdoppelten, bei 2,5-Dihydroxy-BA um ca. 50 % erhöhten. Die größere und weniger polare Methoxygruppe in *ortho*-Stellung verhinderte eine Umsetzung durch das Enzym. Die Methylierung von Anthranilsäure war um ein Drittel reduziert (Mutante: 20,3 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$; SAMT3: 33,6 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). BA wurde in vergleichbaren Mengen methyliert (Mutante: 52,8 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$; SAMT3: 60,5 $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Die SAMT3-Mutante Phe357Tyr zeigte im Vergleich zur SAMT3 nur geringfügige Unterschiede im Substratspektrum. Sie war jedoch nicht mehr in der Lage, 2-Methoxy-BA umzusetzen.



Substrat	Spezifische Aktivität [$\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$]	Relative Aktivität [%]
Salizylsäure	221,1 ± 34,0	100
Benzoessäure	52,8 ± 12,9	23,7 ± 2,2
3-Hydroxy-Benzoessäure	4,1 ± 3,0	1,8 ± 1,1
2,3-Dihydroxy-Benzoessäure	99,9 ± 6,4	45,5 ± 4,1
2,4-Dihydroxy-Benzoessäure	39,8 ± 1,5	18,2 ± 2,1
2,5-Dihydroxy-Benzoessäure	85,1 ± 2,6	39,0 ± 7,2
Anthranilsäure	20,3 ± 1,8	9,2 ± 0,6

Abb 3-21: Kreisdiagramm der von der *H. c.* SAMT3-Mutante Phe357Tyr umgesetzten Substrate. Die spezifischen und relativen Aktivitäten des Enzyms mit den Substraten wurden aufgelistet. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen ($100\% = 221,1 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). 2 x durchgeführt

Die Tabelle 3-8 fasst die ermittelten Substratspektren der Wildtypenzyme sowie ihrer Mutanten zusammen. Die Mutanten, die eine ausreichende enzymatische Aktivität für den radioaktiven Enzymassay aufwiesen, zeigten alle eine maximale Aktivität mit SA als Substrat. Nur die Doppelmutante mit den AS-Substitutionen an den Positionen 156 und 216 der SAMT1 besaß eine höhere spezifische Aktivität mit BA. Die Substitution von Aminosäuren hatte in den einzelnen Mutanten unterschiedliche Einflüsse auf die Enzymaktivität. Nur SA und 2,3-Dihydroxy-BA wurden von allen Enzymen umgesetzt. Die Substrate 3,4-Dihydroxy-BA, Jasmonsäure sowie 2-, 3- und 4-Hydroxy-Zimtsäure wurden von keinem der untersuchten Enzyme umgesetzt.

Zusammenfassung der Relative Aktivitäten der <i>H. c.</i> SAMT-Enzyme mit den umsetzbaren Substraten. Enzyme mit 100% SAMT3				
Met156His	Val231Ile	Val231Phe	Phe357Tyr	
100	100	100	100	
83 ± 6,2	25 ± 1,9	0	23,7 ± 2,2	
46,2 ± 12,5	0,7 ± 0,1	0	1,8 ± 1,1	
1,6 ± 1,4	0	0	0	
45,5 ± 13,6	64,8 ± 13,9	23,9 ± 7,2	45,5 ± 4,1	
2,7 ± 2,8	2,4 ± 1,1	15,8 ± 4	18,2 ± 2,1	
12,1 ± 10	23 ± 2,1	23 ± 2,1	39 ± 7,2	
0	0,6 ± 0,1	0	0	
1,7 ± 1,8	0	0	0	
35,8 ± 27,3	14,9 ± 1	0	0	
45,5 ± 31	8,3 ± 1	0	9,2 ± 0,6	
1,7 ± 1,2	0	0	0	
0	0	1,9 ± 0,3	0	

Tab. 3-8:

	SAMT1	SAMT1 + Leu216Met	Met156His + Leu216Met	SAMT3
Salizylsäure	100	100	49 ± 11	100
Benzoesäure (BA)	7,8 ± 2,6	8,7 ± 0,4	100	23,4 ± 4,5
3-Hydroxy-BA	0,4 ± 0,3	0	6,3 ± 0,2	4,6 ± 2,4
4-Hydroxy-BA	0	0	2,8 ± 6,4	0
2,3-Dihydroxy-BA	38,4 ± 6,4	12,1	3,8 ± 1,4	41,5 ± 20,9
2,4-Dihydroxy-BA	0,2 ± 0,3	7,8	0	6,1 ± 4,1
2,5-Dihydroxy-BA	5,3 ± 1,8	0	3,1 ± 0,4	21,8 ± 3,9
2,6-Dihydroxy-BA	0,4 ± 0,1	0	0	0
3,5-Dihydroxy-BA	0	0	0	0
2-Methoxy-BA	0	0	42,4 ± 6,6	9,0 ± 8,9
Anthranilsäure	1,2 ± 1,4	2,4 ± 1,5	19,7 ± 3,3	12,9 ± 5,5
Nikotinsäure	0	0	0	0
Zimtsäure	0	0	0	0

3.7. Enzymkinetische Parameter

Der Substratumsatz in den Enzymen der *H. c.* SAMT lief nach den Gesetzmäßigkeiten der Michaelis-Menten-Kinetik ab. Zur Bestimmung von K_M und v_{max} der einzelnen Enzyme wurde in Vorversuchen getestet, in welchem Substrat-Konzentrationsbereich eine lineare Steigerung der Produktbildung erreicht werden konnte. Die Ergebnisse werden am Beispiel der SAMT3-Mutante Val231Ile gezeigt (Abb. 3-22). Im Vorversuch wurden 0,05; 0,3 und 0,5 mM SA bzw. BA eingesetzt. Nach 5, 10, 20 und 30 min wurde die Reaktion abgestoppt und die Produktmenge bestimmt. Die Grafik zeigt, dass im Fall von SA bei allen Konzentrationen ein linearer Anstieg der Produktmenge zu verzeichnen war. Bei BA war nach 20 min keine weitere Zunahme der Produktmenge nachzuweisen. In der Konsequenz wurde in diesem Fall die Inkubationszeit zur K_M -Wert-Bestimmung auf 20 min reduziert. Bei einer Substratkonzentration von 0,05 mM BA wurde nur sehr wenig Produkt gebildet, was die

Fehleranfälligkeit sehr hoch machte. Daher wurde für weitere Untersuchungen eine Mindestkonzentration von 0,1 mM BA verwendet.

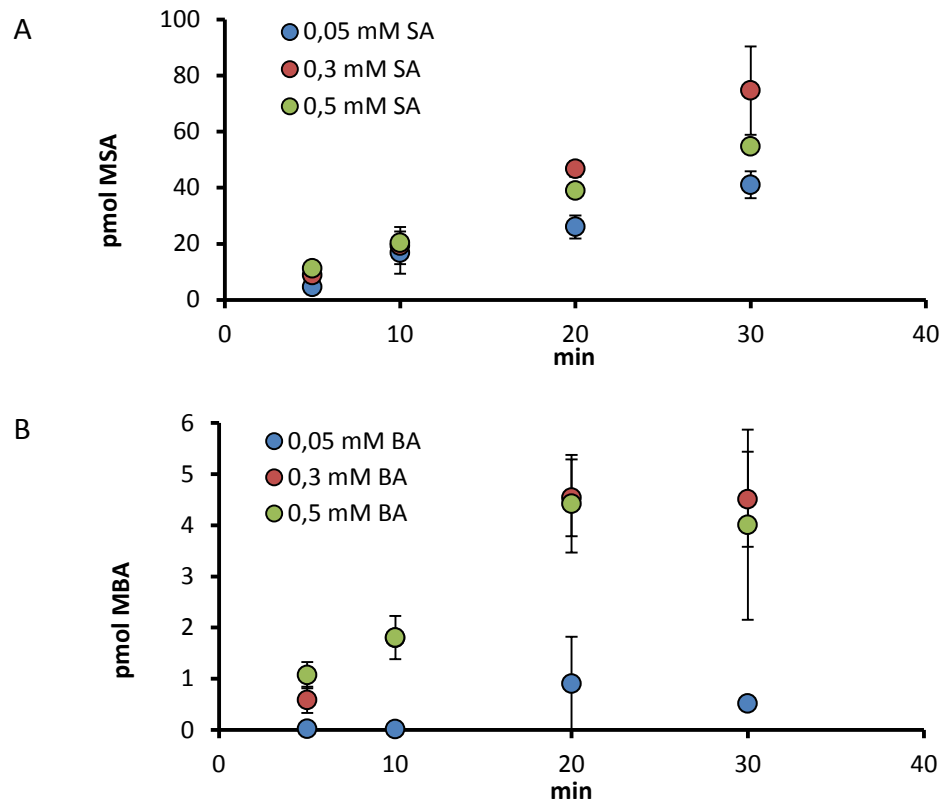


Abb. 3-22: Vorversuch zur K_M -Wertbestimmung der SAMT3-Mutante Val231Ile: Darstellung der Synthese von MSA (**A**) und MBA (**B**) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Zusatz von 0,05; 0,3 und 0,5 mM SA (**A**) und BA (**B**). $n=2$

Im Beispiel der SAMT3-Mutante Val231Ile wurden zur Bestimmung des K_M -Wertes für SA 0,01-0,5 mM SA eingesetzt. Die grafische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit (v) des Enzyms bei diesen Konzentrationen zeigte einen linearen Anstieg bis zu einer Konzentration von 0,4 mM SA (Abb. 3-23). Die Reaktionsgeschwindigkeit bei 0,5 mM fiel deutlich ab. Daher blieb dieser Wert bei der Ermittlung des K_M -Wertes unberücksichtigt, um eine Verfälschung des Anstiegs der Funktion zu verhindern.

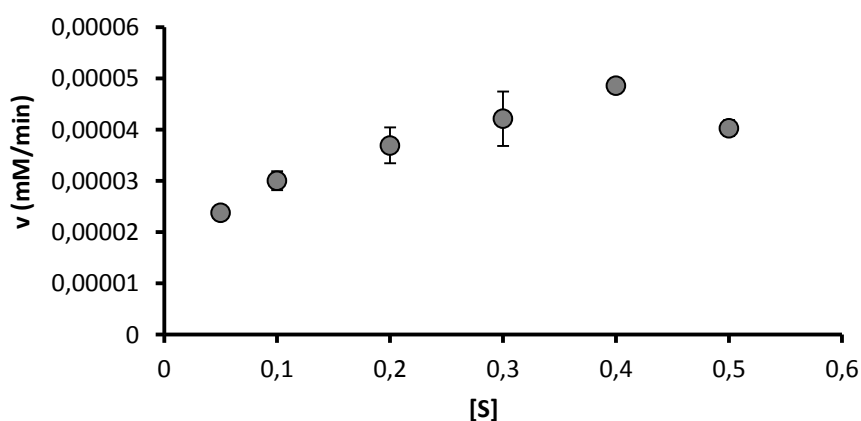


Abb. 3-23: Darstellung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile in Abhängigkeit von der SA-Konzentration bei einer Inkubationszeit von 30 min. n=4

Die Linearisierung der Daten erfolgte nach Lineweaver-Burk, d. h. $1/v$ wurde als Funktion von $1/[S]$ aufgetragen. Dies führt dazu, dass kleine Abweichungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei geringen Substratkonzentrationen großen Einfluss auf den Verlauf der Regressionsgeraden und damit auch auf die abgeleiteten K_M - und v_{\max} -Werte haben können. Daher wird die Linearisierung nach Lineweaver-Burk als schlechtestes Linearisierungsverfahren angesehen. Aus diesem Grund wurden die Messreihen zusätzlich nach Eadie-Hofstee und Hanes-Wilkinson linearisiert.

Die durch die Linearisierung nach Lineweaver-Burk ermittelte Funktion wurde zur Berechnung der Schnittstellen mit den Achsen genutzt (Abb. 3-24). Die reziproken Werte ergaben K_M und v_{\max} für die Mutante Val231Ile mit SA. Für SA resultierte er in einem K_M von 0,057 mM sowie einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} von 49,8 nM/min.

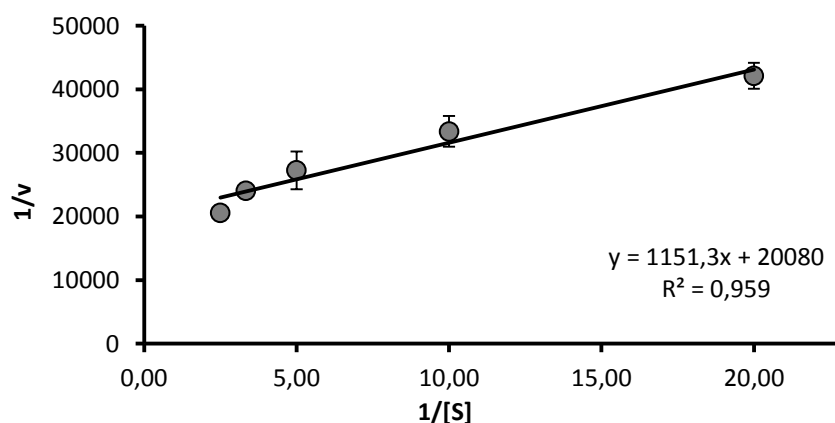
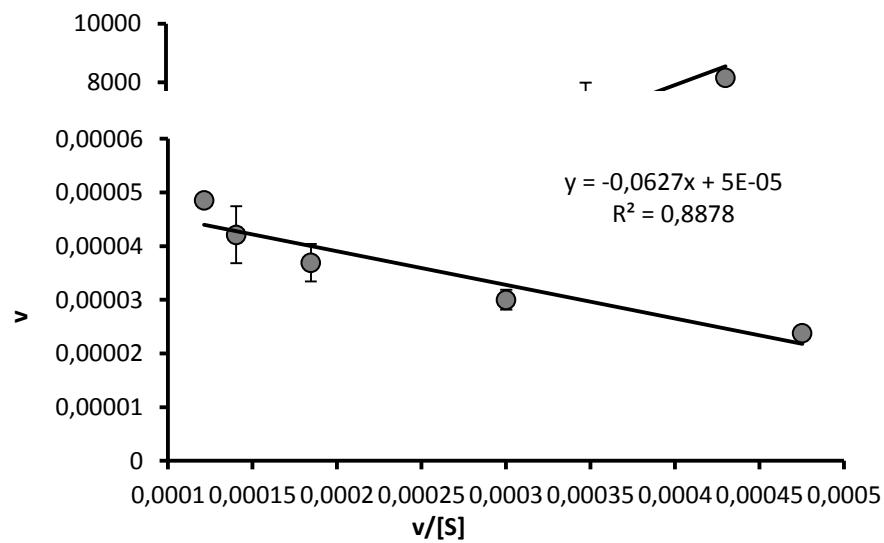


Abb. 3-24: Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Lineweaver-Burk ($1/v$ als Funktion von $1/[S]$), SAMT1 Val231Ile. n=4

Zur Linearisierung nach Eadie-Hofstee wurde v als Funktion von $v/[S]$ aufgetragen (Abb. 3-25). Dabei entsprach der K_M -Wert dem negativen Anstieg der Funktion und v_{\max} dem



Schnittpunkt mit der y-Achse. Der Fehler bei dieser Linearisierungs-Methode stieg mit $v/[S]$. Der K_M -Wert hatte einen Wert von 0,0627 mM, v_{\max} lag bei 50 nM/min.

Abb. 3-25: Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Eadie-Hofstee (v (mM/min) als Funktion von $1/[S]$), SAMT1 Val231Ile $n=4$

Des Weiteren wurde eine Linearisierung nach Hanes-Wilkinson vorgenommen. Hierbei wurde $v/[S]$ als Funktion von $[S]$ aufgetragen (Abb. 3-26). Ausreißer bewirkten nur eine geringe Verfälschung der Messpunkte. Der Anstieg der Regressionsgerade entsprach dem reziproken Wert für v_{\max} , der Schnittpunkt mit der x-Achse bildete den negativen K_M -Wert. In diesem Fall ergaben sich folgende Werte der Mutante Val231Ile für SA: $K_M = 0,085$ mM, $v_{\max} = 56,7$ nM/min.

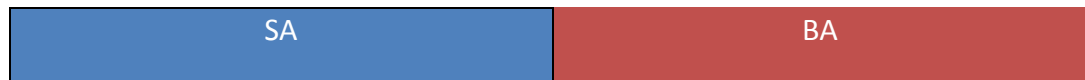


Abb. 3-26: Linearisierung der Anfangsgeschwindigkeit der SAMT3-Mutante Val231Ile bei steigenden SA-Konzentrationen nach Hanes-Wilkinson ($v/[S]$ als Funktion von $[S]$), SAMT1 Val231Ile. $n=4$

Wie am Beispiel der SAMT3-Mutante gezeigt, ergaben die verschiedenen Methoden der Linearisierung vergleichbare K_M - und v_{\max} -Werte. Jedoch konnten nur in neun von 13 Fällen Linearisierungen nach Eadie-Hofstee und Hanes-Wilkinson durchgeführt werden. Teilweise traten große Streuungen der Werte auf, die durch Regression nicht sinnvoll linearisiert werden konnten (Tabelle 7-1 im Anhang). In allen Fällen führte die Linearisierung nach Lineweaver-Burk zu Werten mit relativ geringer Streuung, d.h. mit hohem Bestimmtheitsmaß. In den Fällen, in denen nach Eadie-Hofstee und Hanes-Wilkinson ausgewertet werden konnte, wichen die Werte kaum von der Lineweaver-Burk-Methode ab. Daher wurden zur Bildung von Mittelwerten und weiterer enzymkinetischer Parameter die K_M - und v_{\max} -Werte verwendet, die sich nach Lineweaver-Burk ableiten ließen. Die Tabelle 3-9 zeigt die Mittelwerte der K_M - und v_{\max} -Werte der SAMT1 und 3 sowie ihrer Mutanten nach Lineweaver-Burk.

	K_M [μM]	v_{\max} [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]	K_M [μM]	v_{\max} [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]
SAMT1	249	0,05	0,0015	6,19	20648	0,03	0,0008	0,039
SAMT1 Leu216Met	138	0,027	0,0018	11,08	1000	0,013	0,00029	0,27
SAMT1 Met157His+ Leu216Met	106	0,120	0,0029	33,8	221	0,065	0,00258	11,94
SAMT3	62	0,126	0,0172	278,1	156,5	0,040	0,0054	34,59
SAMT3 Met156His	123	0,274	0,0031	33,27	1905	0,393	0,0172	10,49
SAMT3 Val231Ile	40	0,036	0,00245	63,33	1458	0,030	0,0006	0,484
SAMT3 Val231Phe	1428	0,337	0,0117	9,02	/	/	/	/
SAMT3 Phe357Tyr	168	0,103	0,0075	47,84	2221	0,018	0,00068	0,306

Tab. 3-9: K_M - und v_{\max} -Werte der *H. c.* SAMT-Enzyme mit SA und BA, ermittelt durch lineare Regression nach Lineweaver-Burk sowie daraus abgeleitete Wechselzahlen (k_{cat}) und katalytische Effizienzen (k_{cat}/K_M) (Werte des SAMT1-Wildtyps nach Krohn 2005).

Neben den K_M - und v_{\max} -Werten stellt die Tabelle 3-9 die ermittelten Wechselzahlen sowie die katalytischen Effizienzen der untersuchten Enzyme dar. Dabei waren in allen Fällen, in denen beide Substrate untersucht werden konnten, die K_M -Werte für SA kleiner als für BA. Bei der SAMT3 und der Doppelmutante der SAMT1 Met156His+Leu216Met waren die Unterschiede um den Faktor zwei bis drei eher gering. Alle anderen Enzyme wiesen einen vielfach größeren K_M für BA auf (z. B. SAMT1 Leu216Met: x 7, SAMT1: x 82). Entsprechend waren die Wechselzahlen und katalytischen Effizienzen in den meisten Fällen für SA größer als für BA. Die Wechselzahlen für SA lagen dabei zwischen 0,0015 und 0,0172 s^{-1} um den Faktor zwei bis 11 über den Wechselzahlen für BA (0,0003-0,0054 s^{-1}). Nur die SAMT1 Mutante Met156His besaß eine 5,5 fach größere Wechselzahl für BA (0,0172 s^{-1} , SA 0,0031 s^{-1}), wobei die katalytische Effizienz aber dreimal größer für SA war. Die SAMT1 Doppelmutante wies vergleichbare Wechselzahlen mit beiden Substraten auf, k_{cat}/K_M unterschied sich nur um den Faktor 3 (SA: 33,8 $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, BA: 11,94 $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Im Vergleich zur SAMT1 ($K_M=249 \mu\text{M}$)

wurde der K_M -Wert durch die Einführung der Mutationen für beide Substrate verringert. Die SAMT1-Mutante Met156His+Leu216Met besaß einen K_M mit SA von 106 mM. Der K_M -Wert für BA verringerte sich von 20 mM um den Faktor 90 mit der Einführung der Mutationen (Mutante: 221 μ M). Die Mutationen veränderten deutlich die Spezifitäten für SA und BA.

Die SAMT3-Mutanten zeigten im Vergleich zur SAMT3 (62 μ M) nur leicht gesteigerte K_M -Werte für SA (106-168 μ M), jedoch deutlich gesteigerte K_M -Werte für BA (SAMT3=156,5 μ M, Mutanten= 1-2,2 mM). Nur die Mutante Val231Ile zeigt verglichen mit der SAMT3 einen geringeren K_M -Wert mit SA (40 μ M) und die Mutante SAMT3 Val231Phe benötigt eine sehr viel höhere Konzentration an SA, um ihre halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, ihr K_M lag bei 1,4 mM. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzyme bewegten sich zwischen 0,027 und 0,337 μ M*min⁻¹ mit SA und 0,01 und 0,065 für BA. Eine Ausnahme bildet die SAMT3-Mutante Met156His, deren v_{max} für BA bei 0,393 μ M*min⁻¹ vergleichsweise hoch und sogar über der für SA lag (0,274 μ M*min⁻¹)

Die Tabelle 3-10 fasst zusammen, welche Enzyme eine zur Bestimmung des Substratspektrums und enzymkinetischer Parameter ausreichende Aktivität im radioaktiven Enzymassay zeigten. Neben den Wildtyp-Enzymen wiesen 6 Mutanten entsprechende Aktivitäten auf.

Tab. 3-10: Übersicht über SAMT-Enzyme, mit ausreichender Enzymaktivität zur Bestimmung der Substratspektren. Grau dargestellte Mutanten wurden bei nahfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

GC/MS: – ohne Aktivität **(+)** Produkte nur in Spuren
 + < 10 % ++ 10-100 % +++ > 100 % (% im Verhältnis zur Indolmenge)
Überexpression: – kein lösliches Protein **(+)** Protein nur in Spuren
 + bis +++ wenig bis viel Protein nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie
Enzymaktivität: – Proteine ohne Aktivität +++ Proteine mit hoher Aktivität

Untersuchte Proteine der <i>H. c.</i> SAMT	Nachweis m.H. GC/MS	Über- expression	Enzym- aktivität
SAMT1	n.d.	+++	+++
SAMT1 Leu216Met	++	+++	+++
SAMT1 Trp232Leu	-	(+)	-
SAMT1 Phe357Thr	(+)	(+)	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met	++	+++	+++
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu	-	-	-
SAMT1 Leu216Met+Phe357Thr	+	-	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met+Trp232Leu	-	-	-
SAMT1 Met156His+Leu216Met+ Phe357Thr	+	+++	-
SAMT1 Leu216Met+Trp232Leu+Phe357Thr	-	-	-
SAMT3	++	+++	+++
SAMT3 Met156His	++	+++	+++
SAMT3 Val231Ile	+++	+++	+++
SAMT3 Val231Phe	++	+++	+++
SAMT3 Val321Phe	+	-	-
SAMT3 Val321Tyr	+	+	-

SAMT3 Phe357Ser	+	++	-
SAMT3 Phe357Tyr	+++	+++	+++
SAMT3 Met156His+Trp232Leu	(+)	(+)	-
SAMT3 Met156His+Phe357Thr	(+)	-	-
SAMT3 Met156His+Trp232Leu+Phe357Thr	-	-	-

3.8. *In silico* Modellierung der *H. c.* SAMT

Auf Grundlage der Kristallstruktur der *Clarkia breweri* (*C. b.*) SAMT war es möglich ein Modell der Struktur der *H. c.* SAMT zu erstellen. Dies erfolgte mit Hilfe des SPDB-Viewers, der die Rohsequenz der *H. c.* SAMT mit der Struktur der *C. b.* SAMT verglich. Auf Grundlage dieses Vergleichs wurden den AS der *H. c.* SAMT räumliche Koordinaten zugeordnet. Mögliche Strukturen von Sequenzabschnitten ohne Entsprechungen in der *C. b.* SAMT wurden mit Hilfe der frei nutzbaren Software Superlooper der Bioinformatik der Charité Berlin ermittelt und ausgewählt (Hildebrand *et al.* 2009). Eine Energieminimierung überprüfte und optimierte die Bindungslängen und Winkel innerhalb des Modells.

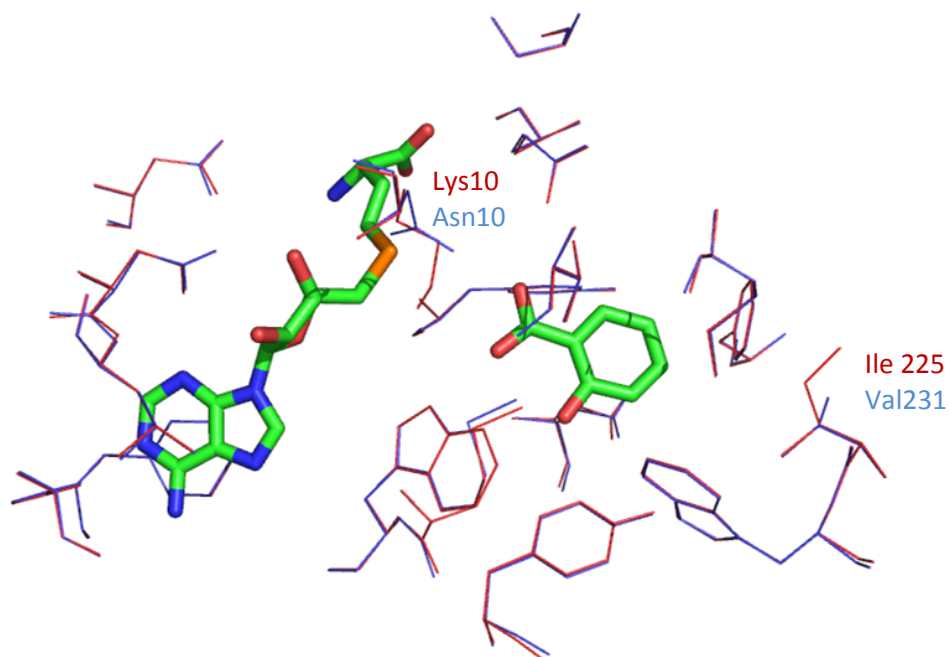


Abb. 3-27: Computermodell der AS der aktiven Zentren der *H. c.* (blau) und *C. b.* (rot) SAMT und der Substrate SAH und SA (grün), abweichende AS-Reste sind markiert. Die Abbildung wurden mit Pymol erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

Wurden die aktiven Zentren der SAMT-Enzyme aus *H. c.* und *C. b.* übereinander gelegt, zeigte sich, dass die AS die gleiche räumliche Anordnung besitzen (Abb. 3-27). Die AS der *H. c.* SAMT wurden in blau, die der *C. b.* SAMT in rot gezeigt. Leichte Abweichungen waren in den Bindungswinkeln einzelner Kohlenwasserstoffreste zu erkennen. Beide Sequenzen unterschieden sich nur an zwei Positionen: an der Position 10 war in der *H. c.* SAMT statt eines Lysins ein Asparagin zu finden, dem Ile225 entsprach im *H. c.* Enzym das Val231. Die Methode lieferte einen ersten Eindruck der Struktur des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT.

3.8.1. Docking von Substraten in das Homologie-Modell der *H. c.* SAMT

Die Lage der Substrate in Relation zu den AS der aktiven Tasche der *H. c.* SAMT konnte für das modellierte Protein nur als Richtlinie gesehen werden, da sie der Kristallstruktur der *C. b.* SAMT entstammen. Für die Ermittlung der wahrscheinlichen Lage der Substrate innerhalb der *H. c.* SAMT wurden Docking Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Lage der SA im aktiven Zentrum des Wildtyps simuliert, da das Enzym *in vivo* und *in vitro* dieses Substrat umsetzte. Diese Experimente sollte die Richtigkeit weiterer Docking-Experimente in den Mutanten bestätigen. Im Ergebnis konnte keine Substratausrichtung in der aktiven Tasche erhalten werden, welche eine Übertragung der Methylgruppe ermöglicht hätte, da die Carboxylgruppe nie in die nötige Nähe zum Methylgruppendonor gelangte. Die Abb. 3-28 zeigt beispielhaft die simulierte Ausrichtung von SA im Modell des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT1 (gelb). Es ist deutlich der Unterschied zur korrekten Ausrichtung zu sehen, welche in der *C. b.* SAMT zu finden ist (grün).

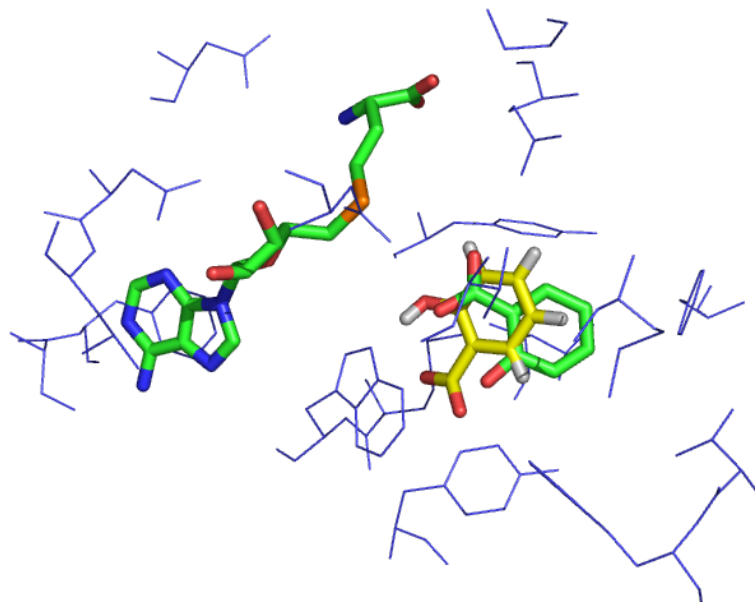


Abb. 3-28: ComputermodeLL der AS des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT1 (blau) mit den Substraten der *C. b.* SAMT (grün) sowie der theoretisch berechneten Ausrichtung der SA (gelb) nach GOLD. Die Abbildung wurden mit Pymol erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org)

3.9. Klonierung und Aufreinigung der SAMT1 zur Kristallisation

Da ein Docking verschiedener Substrate in das Homologiemodell der *H. c.* SAMT nicht gelang, war anzunehmen, dass dieses Modell für derartige Simulationen von unzureichender Qualität war. Eine Kristallisation des Enzyms bot die Möglichkeit der Aufklärung der tatsächlichen Struktur der *H. c.* SAMT. Dazu waren ca. 10 mg rekombinanten Proteins von großer Reinheit notwendig. Vorbereitend war es nötig das Fragment zur Kodierung der SAMT1 in den pET151/D-TOPO-Vektor zu klonieren, da dieser eine spätere Abspaltung des His-Tags vom rekombinanten Protein erlaubte. Als Matrize diente zu diesem Zweck der pET101/D-TOPO-Vektor mit der *samt1* nach Heidebrecht (2005).

3.9.1. Amplifikation der *H. c. samt1*

Die PCR mit genspezifischen Primern des pET101/D-TOPO-*samt1*-Vektors ergab ein Fragment von ca. 1,1 kb Größe (Abb. 3-29, Spur 1). Dies entsprach der Größe der *H. c.* SAMT von 1104 Nukleotiden.

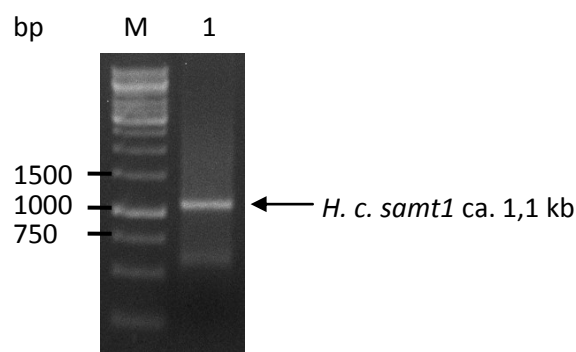


Abb. 3-29: Agarosegel des PCR-Produktes nach Amplifikation des *samt1*-Fragments aus dem pET101/D-TOPO-Vektor (Heidebrecht 2005).
M Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas)
1 PCR-Produkt nach Amplifikation der *H. c. samt1*

3.9.2. Ligation der *samt1* in den pET151/D-TOPO-Expressionsvektor

Das Fragment wurde aus dem Agarose-Gel eluiert (2.2.3.), in den pET151/D-TOPO-Vektor ligiert und der Ligationsansatz in TOP10-Zellen transformiert. Auf LB-Amp¹⁰⁰-Platten konnten

eine Vielzahl von positiven Klonen selektiert werden. Davon wurden neun Klone in der Kolonie-PCR auf die Insertion der *samt1* überprüft. Die dazu genutzten Primer T7-Promotor und T7-Terminator führten im Idealfall zu einem PCR-Produkt von 1370 Nukleotiden Länge. Wie in der Abbildung 3-30 zu sehen, konnte in zwei von neun getesteten Klonen ein entsprechendes Fragment amplifiziert werden (Spuren 7 und 9). Die Sequenzierung zeigte im Fall des Klons 9 die korrekte Sequenz, bei Klon 7 fehlte ein kleiner Sequenz-Abschnitt, was den Größenunterschied im Agarosegel erklärt.

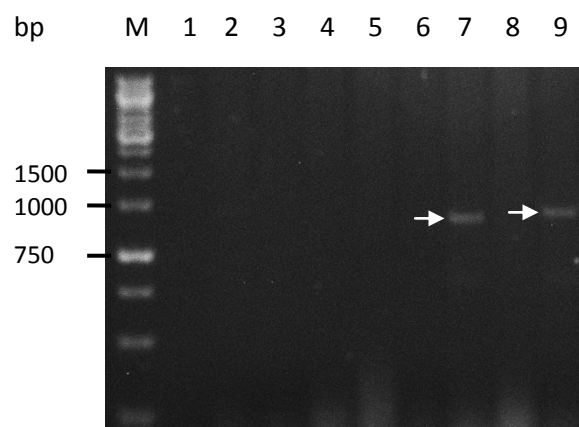


Abb. 3-30: Agarosegel der Kolonie-PCR-Produkte nach Ligation der *samt1* in den pET151/D-TOPO-Vektor
M Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas)
1-9 Produkte der Kolonie-PCR einzelner Klone mit T7-Promotor und T7-Terminator

Die Sequenzierung mit den T7-Promotoren zeigte, dass im Klon 9 das Fragment korrekt in den Vektor kloniert wurde. Der Vektor kodierte auf diese Weise die *samt1* mit N-terminalem His-Tag. Die AS-Sequenz des rekombinanten Proteins enthielt dadurch eine TEV-Erkennungsstelle, welche eine spätere Abspaltung des His-Tags ermöglichte. Die Abbildung 3-31 zeigt die Plasmidkarte des pET151/D-TOPO-*samt1*-Vektors. Durch das *lacI*-Gen wurde die IPTG-induzierte Expression der SAMT1 möglich. Das Ampicillin-Resistenz-Gen ermöglichte die Selektion der Klone. Der so hergestellte pET151/D-TOPO-*samt1*-Vektor wurde in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen transformiert und die Überexpression unter verschiedenen Bedingungen getestet.

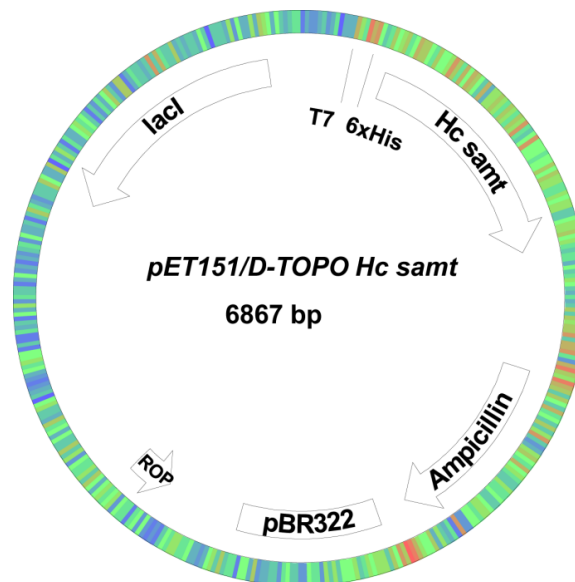


Abb. 3-31: Plasmidkarte des pET151-D/TOPO-*samt1*-Vektors
Enthält das PCR-Produkt der *H. c. samt1* (Heidebrecht, 2005) mit N-terminalem 6xHis-Tag. Das *lacI*-Gen ermöglicht die IPTG-Induktion. Die Ampicillin-Resistenz dient der Selektion (Plasmidkarte erstellt mit pDRAW32, www.acaclone.com, T rot, C blau, A grün, G gelb)

3.9.3. Testung der Expressionsbedingungen für den pET151/D-TOPO-Vektor und **Aufreinigung der rekombinanten SAMT1**

Die Expression des pET151/D-TOPO-*samt1*-Vektors lieferte unter optimalen Bedingungen die lösliche SAMT in Kombination mit einem N-terminalen His-Tag. Das rekombinante Protein hatte eine theoretische Länge von 406 Aminosäuren, was einer Masse von 45,22 kDa entsprechen würde. Zwischen His-Tag und der SAMT lag eine TEV (tobacco etch virus)-Erkennungstelle (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly), welche eine spätere Abtrennung des His-Tag ermöglichte. Die Spaltung erfolgte zwischen Glutamin und Glycin. Das entstandene Protein ohne His-Tag hatte eine theoretische Länge von 375 AS und einer Masse von 42,07 kDa. Eine Expression des rekombinanten Proteins gelang sehr gut in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen bei 20°C und 180 rpm (Abb. 3-32, A). Auch in BL21(DE3)pBB540+pBB542-Zellen konnte rekombinantes Protein angereichert werden (Abb. 3-32, B). Die Abbildungen zeigen die Aufreinigung der Fusionsproteine über Ni-NTA-Affinitätschromatografie. Dabei waren in Rohextrakt und Pellet der BL21(DE3)pSBET-b-Zellen größere Anreicherungen an rekombinantem Protein zu erkennen. Von der Säule konnten große Mengen an relativ reinem Protein eluiert werden. Die Expression mit den pBB540- und pBB542-Helferplasmiden, welche für vier zusätzliche Chaperone kodierten, führten nicht zur Erhöhung der Protein-Ausbeute. Wurden Extrakte dieser Versuche auf eine Ni-NTA-Säule gebracht, banden weitere Proteine an die Säule, welche mit dem Fusionsprotein eluiert wurden und die Reinheit der SAMT herabsetzten (Abb. 3-32, B). Daher wurde in den folgenden Versuchen die Überexpression in BL21(DE3)pSBET-b-Zellen bei 20°C durchgeführt. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte affinitätschromatographisch wie im Abschnitt **2.2.15.** beschrieben. Das in den

BL21(DE3)pSBET-b-Zellen überexprimierte Protein konnte in großen Mengen und relativ hoher Reinheit gewonnen werden.

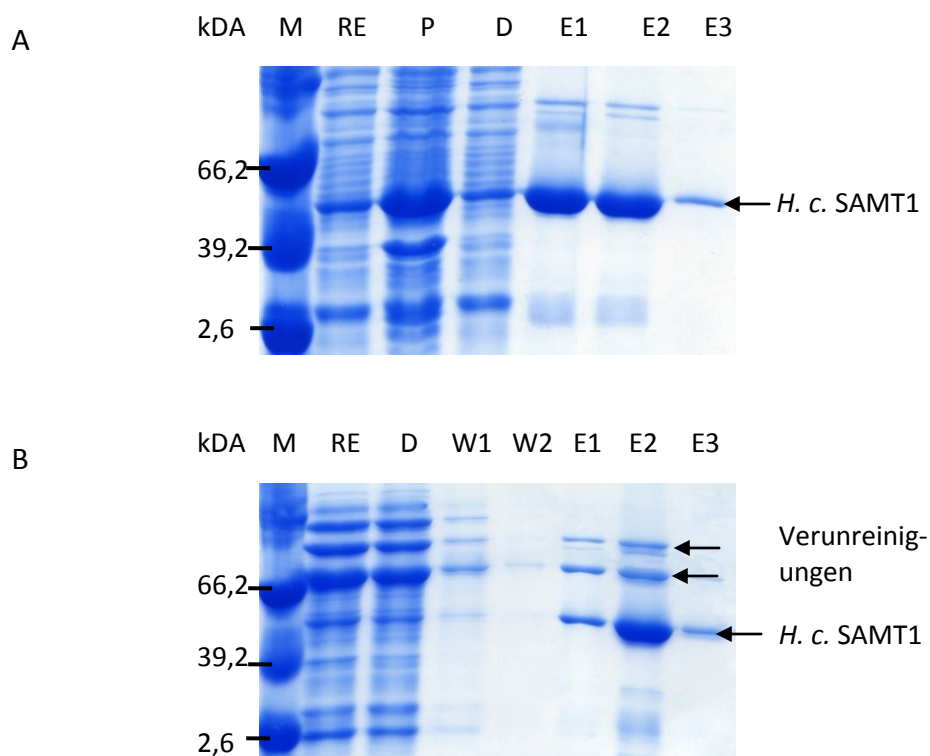


Abb. 3-32: PAA-Gel der Fraktionen der Aufreinigungen rekombinanter SAMT1 (pET151D-TOPO) überexprimiert in BL21(DE3)pSBET-b (**A**) und BL21(DE3)pBB540+pBB542 (**B**),

3.9.4. TEV-Verdau rekombinanter Proteine

Zur Abspaltung des His-Tags wurden die in Abschnitt **2.2.15.2** beschriebenen Bedingungen getestet. Dabei zeigten die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen nur unzureichende Spaltungen des Fusionsproteins (Abb. 3-33). Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte nur zu geringfügigen Verbesserungen. Ein parallel ausgeführter

Test der Enzymaktivität zeigte, dass eine Inkubation bei 30°C bereits nach zwei Stunden zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führte. Auch bei 20°C ließ die Aktivität deutlich nach (Abb. 3-34). Die Temperatur beim TEV-Verdau musste so gering wie möglich gehalten werden, um die Aktivität der Enzyme erhalten zu können.

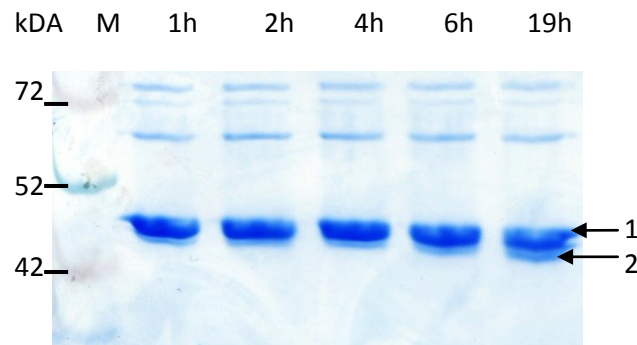


Abb. 3-33: PAA-Gel des TEV-Verdau der *H. c.* SAMT1 nach 1, 2, 4, 6 und 19 h Inkubation bei 4°C, obere Bande (1) rekombinantes Protein, untere Bande (2) SAMT ohne His-Tag
Eine deutlich bessere Abspaltung des His-Tags konnte durch die Inkubation während der Dialyse für 16 Stunden bei 4°C erreicht werden. Ein Großteil des Fusionsproteins konnte dabei gespalten werden (Abb. 3-35, Spur V). Nach dieser Prozedur wies das Enzym eine Aktivität von 53,3 pkat/mg auf, was ca. einem Drittel der Ausgangsaktivität entsprach.

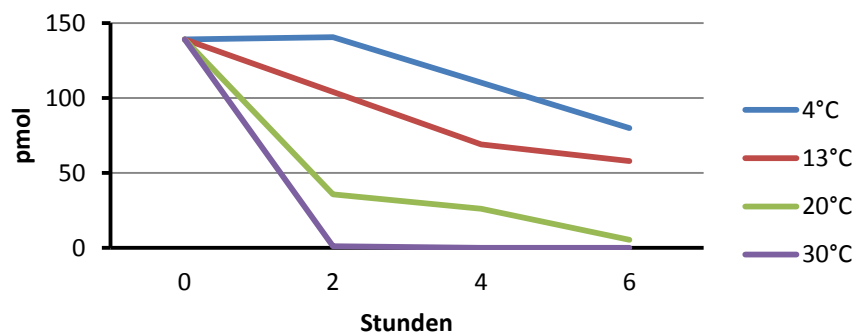


Abb. 3-34: Von 5 µl TEV-Verdauungs-Ansatz gebildete MSA-Menge vor und nach 2, 4 sowie 6 Stunden Inkubation bei 4, 13, 20 und 30°C

3.9.5. Entfernung des His-Tag und der TEV-Protease

Zur Entfernung des His-Tags sowie der ebenfalls His-markierten TEV-Protease wurde eine weitere Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt (**2.2.15**). Das PAA-Gel zeigt in der ersten Spur den Verdauungsansatz vor der Passage über die Säule (Abb. 3-35, Spur V). Es zeigte sich, dass ein Großteil der rekombinanten Proteine gespalten werden konnte. Im Durchfluss und den Spülfractionen passierten die gespaltenen Proteine die Säule. Nicht gespaltene Fusionsproteine, der His-Tag sowie die TEV-Protease banden an die Matrix und

wurden erst mit dem Elutionspuffer von der Säule gespült. Wie in der Abbildung zu sehen, konnte ein großer Teil der abgespaltenen SAMT gewonnen werden (Abb. 3-35, W1-3).

Ein Teil wurde erst mit dem Elutionspuffer von der Säule gewaschen und ging somit für folgende Konzentrierungen und Reinigungen verloren.

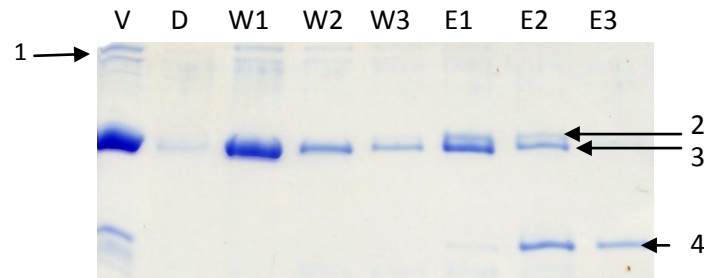


Abb. 3-35: PAA-Gel der affinitätschromatographischen Aufreinigung rekombinanter SAMT1 nach TEV-Verdau.

V Verdau D Durchfluss W 1-3 Waschfraktionen (40, 50, 60 mM Imidazol)

E 1-3 Eluate mit 200 mM Imidazol

Banden: TEV-Protease (1), ungespaltenes Protein (2), gespaltenes Protein (3), His-Tag (4)

3.9.6. Reinigung der gespaltenen Proteine mittels Gelchromatografie

Die konzentrierten Durchfluss- und Waschfraktionen der zweiten Affinitätschromatographie wurden mit Hilfe einer Gelfiltration aufgetrennt, um möglichst reines Enzym zur Kristallisation zu erhalten. Die Trennung erfolgte in einer Sephacryl S-100 HR-Matrix wie unter Abschnitt **2.2.17.** beschrieben. Proben der gesammelten Fraktionen wurden zur Überprüfung der Reinheit im PAA-Gel aufgetrennt und mit der Silberfärbung angefärbt. Das Gelbild (Abb. 3-36) zeigt, dass die Abtrennung von Verunreinigungen ungenügend war. Zwar war zu erkennen, dass die größeren Proteine früher als die kleineren von der Säule kamen, doch eine scharfe Trennung der Proteine verschiedener Größe konnte nicht erreicht werden.

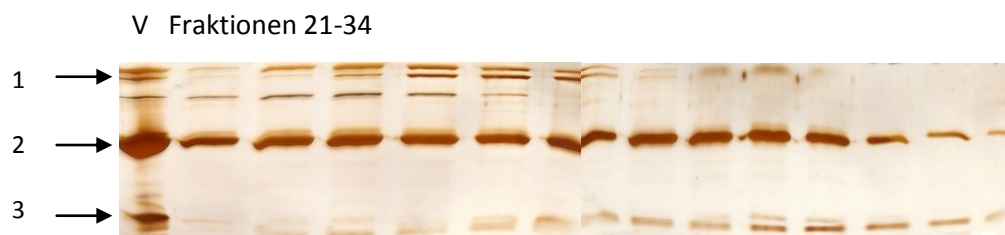


Abb. 3-36: PAA-Gel des Verdauungs-Ansatzes (V) und der FPLC-Fraktionen 21-34 (Silberfärbung) der *H. c.* SAMT1. Mit Pfeilen gekennzeichnet: TEV-Protease (1), gespaltenes Protein (2), His-Tag (3)

Die gepoolten Fraktionen 21-34 wurden in die Abteilung Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle geschickt, um die finale Aufreinigung des Enzyms zur Kristallisation mit den Vorort vorhandenen und erprobten

Methoden (Chromatographie) zu erreichen sowie eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Proteins zu versuchen (Röntgenkristallographie).

4. Diskussion

Methyltransferasen der SABATH-Gruppe sind für die Methylierung sehr verschiedener Substanzen zuständig. Dabei handelt es sich neben verschiedenen Pflanzenhormonen wie Indol-3-Essigsäure (Zhao *et al.* 2007) auch um Duftstoffe, die der Anlockung von Bestäubern sowie der Abschreckung von Fressfeinden dienen. Beispiele für solche Signalstoffe sind Methyljasmonat, Methylantranilat, MSA und MBA (Knudsen *et al.* 2006). Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden AS des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT verändert, um die Auswirkungen auf das Substratspektrum sowie die Spezifität für SA und BA zu untersuchen.

4.1. Aktive Zentren von SAMT- und BSMT-Enzymen

Die Strukturaufklärung der *C. b.* SAMT bildete die Grundlage zur Identifizierung der an der Substratbindung beteiligten AS weiterer verwandter Methyltransferasen. Obwohl sich die aktiven Zentren an nur wenigen Positionen unterscheiden, zeigen sie deutliche Unterschiede in der Substratspezifität und den Substratspektren. So setzen die SAMT-Enzyme aus *Hoya carnosa*, *Nicotiana suaveolens*, *Cestrum nocturnum* und *Datura wrightii* SA mit einer 3-10-fach höheren Aktivität um als BA. Daneben werden nur 2,3- und 2,5-Dihydroxy-BA mit mehr als 15 % relativer Aktivität umgesetzt. Die BSMT-Enzyme bevorzugen BA mit einer 2-10-fach höheren Aktivität im Vergleich zur SA. Diese Enzyme können daneben 3- und 4-Hydroxy-BA, sowie Anthranilsäure und 2-Methoxy-BA mit höheren relativen Aktivitäten umsetzen (Huang *et al.* 2012, im Druck). Die Abb. 4-1 zeigt die Substratprofile einiger SAMT- und BSMT-Enzyme. Dabei fällt die SAMT aus *Stephanotis floribunda* durch ihr großes Substratspektrum auf. Das Enzym kann neben verschiedenen BA-Derivaten auch Zimtsäure und ihre Derivate umsetzen. Ein sehr ähnliches Profil zeigt auch die *N. s.* BSMT1. Diese Enzyme zeigen sich als ausgesprochene Multisubstratenzyme und Gemeinsamkeiten im Aufbau ihrer aktiven Zentren können einen Hinweis darauf geben, welche AS für ein großes Substratspektrum verantwortlich sein könnten. Dafür kommen die AS Met und Leu infrage, welche in der *S. f.* SAMT und der *N. s.* BSMT1 an den der *H. c.* entsprechenden Positionen 216 und 232 positioniert sind (Tab. 1-1).

Auf Grundlage von Vergleichen der aktiven Zentren verschiedener SAMT- und BSMT-Enzyme wurden AS-Substitutionen in der *H. c.* SAMT mittels gerichteter Mutagenese durchgeführt. Austausche wurden an den Positionen 156, 216, 231, 232, 321 und 357 der SAMT1 und 3 vorgenommen. Die ausgetauschten AS wurden in der Abbildung 4-2 grau dargestellt. Gelb eingefärbte AS zeigten sich innerhalb der SAMT/BSMT-Enzyme hoch konserviert. Es wurden

18 Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten hergestellt. Die Ergebnisse wurden im Folgenden diskutiert.

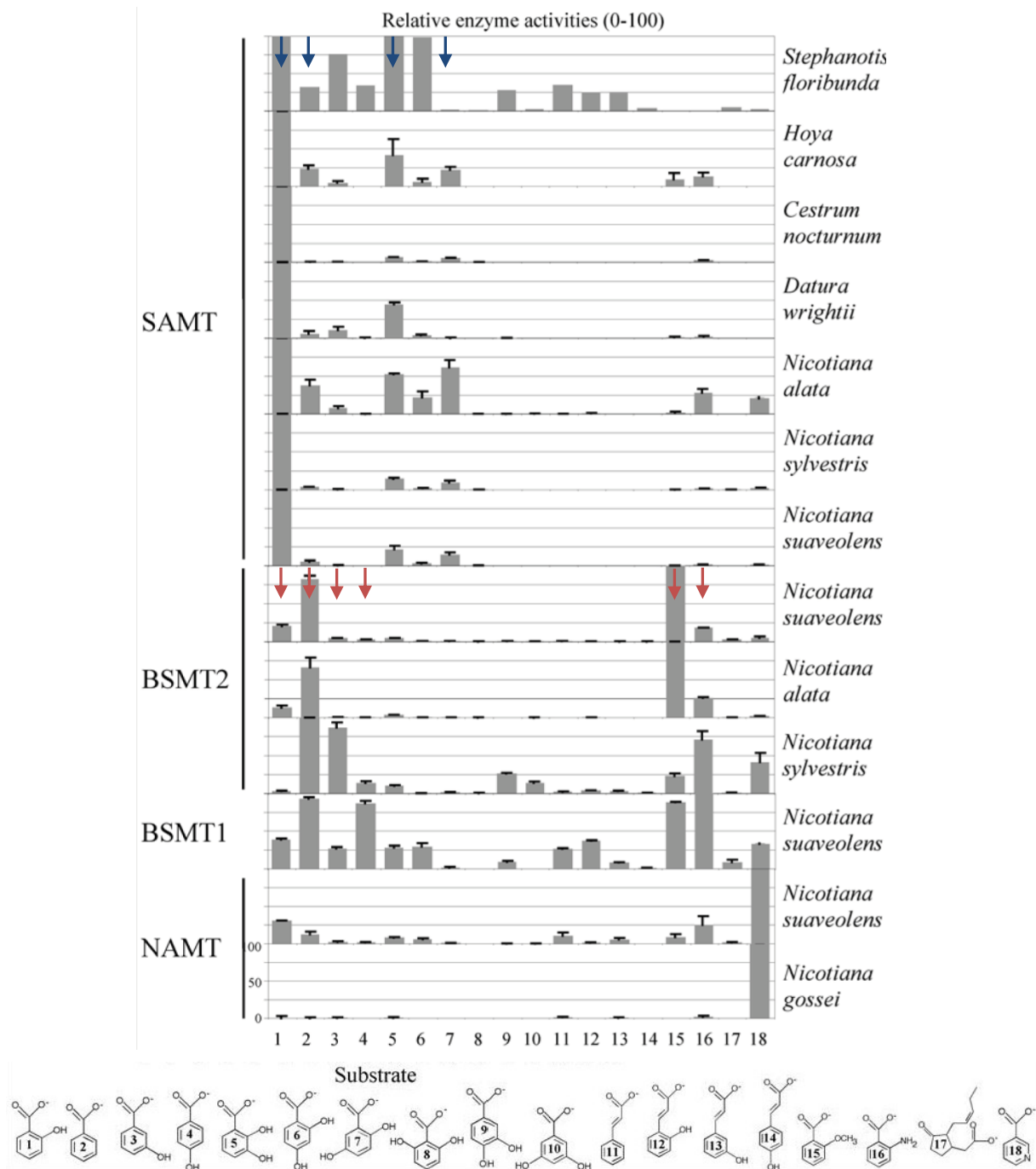


Abb. 4-1: Relative Aktivitäten ausgewählter SAMT- und BSMT-Enzyme sowie einer NAMT mit 18 getesteten Substraten. Für den Enzym-Typ bevorzugt umgesetzte Substrate sind mit Pfeilen markiert (SAMT, blau; BSMT, rot), *Hoya carnosa* =SAMT3 (Abbildung modifiziert nach Huang *et al.* 2012, im Druck)

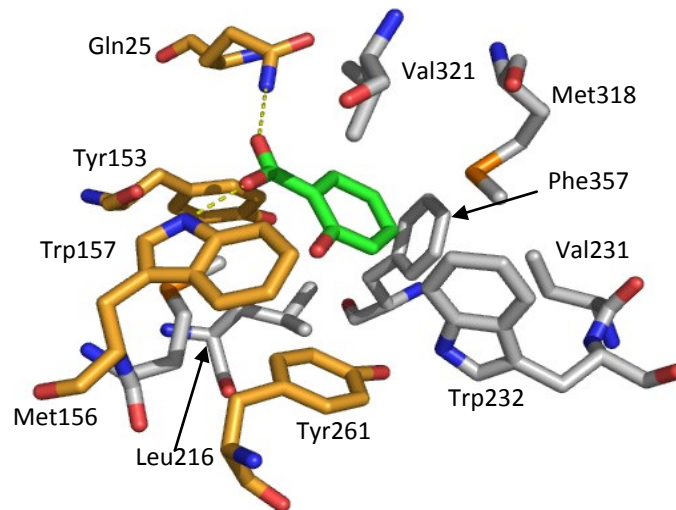


Abb. 4-2: Computermodell der an der Bindung von SA (grün) beteiligte AS der *H. c.* SAMT: Gln25, Tyr153, Trp157, Tyr261 (gelb), sind in den SAMT/BSMT hoch konserviert. Met156, Leu216, Val231, Trp232, Met318, Val321, Phe357 (grau), sind variable AS. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org)

4.2. Charakterisierung der *H. c.* SAMT

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurden die *H. c.* SAMT1 und 2 untersucht (Heidebrecht 2005). Ausgehend von der SAMT1 zeigte sich in dieser Arbeit eine weitere Sequenz, die für die SAMT3 kodiert. Letztere unterschied sich von der SAMT1 an drei Positionen der Nukleotidsequenz, die jedoch nur einen AS-Austausch bewirkten. Da beide Sequenzen in einer Probe zu finden waren, die mittels Reverser Transkription aus m-RNA der *H. c.* Blüte hergestellt wurde (Heidebrecht 2005), war davon auszugehen, dass beide Gene in der Blüte exprimiert wurden. Eine zufällige Mutation schien unwahrscheinlich, da sich beide Sequenzen an drei Positionen der Nukleotidsequenz unterschieden.

Bei den SAMT-Enzymen aus *H. c.* handelt es sich um florale Enzyme, die zur Synthese von Blütenduftstoffen beitragen (Pott 2003). Neben β -Linalool, dem Hauptbestandteil des Duftes, waren die Methylester von SA und 2-Methoxy-BA sowie 12 weitere Substanzen im Blütenduft der *H. c.* nachweisbar (Heidebrecht 2005). Erste Untersuchungen des Substratspektrums der SAMT1 zeigten, dass das Enzym neben der SA auch in der Lage war BA zu methylieren. Der Nachweis der Methylierungsaktivität erfolgte im *E. coli*-Rohextrakt mit dem überexprimierten Enzym. Weiterhin wurden die jeweiligen Substrate bei Induktion der Zellkultur dazugegeben, dabei konnten die Methylester von SA, BA und 2,3-Dihydroxy-BA nachgewiesen werden (Pott 2003). Der Petalenrohextrakt zeigte außerdem Aktivitäten mit 4-Hydroxy-, 2,5-Dihydroxy-, 2,6-Dihydroxy-, 3,4-Dihydroxy-, 3,5-Dihydroxy- und 2-Methoxy-BA sowie mit Zimtsäure, deren einfach hydroxylierten Derivaten und Jasmonsäure.

Erst in den nachfolgenden Arbeiten wurde das Substratspektrum der aufgereinigten, rekombinanten SAMT1 ermittelt (Heidebrecht 2005). Der Nachweis der Methylierungs-Produkte erfolgte im radioaktiven Enzymtest unter Zugabe von ^{14}C -SAM (Pichersky *et al.* 1994). Die Abb. 4-3 zeigt die innerhalb dieser Arbeit ermittelten Substratspektren der SAMT1 und 3 im Vergleich. Da die SAMT1 neben SA nur wenige Substrate mit niedriger Effizienz umsetzte, besaß sie eine recht hohe Spezifität für SA. Die SAMT3 dagegen zeigte eine geringere Spezifität für SA, da sie ebenso BA, 2,3- und 2,5-Dihydroxy-BA mit > 20 % relativer Aktivität umsetzte. Die spezifische Aktivität mit SA lag mit $257 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ deutlich unter der der SAMT 1 ($404,9 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$). Beide Enzyme unterschieden sich nur an einer Position: die AS 215 wurde in der SAMT1 durch Phenylalanin und in der SAMT3 durch Isoleucin gestellt. Diese AS lag in direkter Nachbarschaft zum Leu216 des aktiven Zentrums. Der Austausch des großen Phenylalanins gegen das kleine Isoleucin konnte sich somit ebenfalls auf die Architektur des aktiven Zentrums auswirken, selbst wenn es nicht direkt an der Substratbindung beteiligt war (Zubieta *et al.* 2003). Die Unterschiede im Substratspektrum der SAMT1 und 3 unterstützten diese Aussage. Die SAMT3 konnte mehr Substrate mit größerer Effektivität umsetzen, was für eine Vergrößerung des aktiven Zentrums sprach (Abb. 4-3). Die Umsetzung von in *ortho*-Position substituierten BA-Derivaten war deutlich besser. So konnte von der SAMT3 2-Methoxy-BA mit einer relativen Aktivität von 9 % umgesetzt werden, die Aktivität mit Anthranilsäure war um das 10-fache im Vergleich zur SAMT1 gesteigert. Nur die symmetrisch hydroxylierte 2,6-Dihydroxy-BA konnte von der SAMT3 nicht umgesetzt werden.

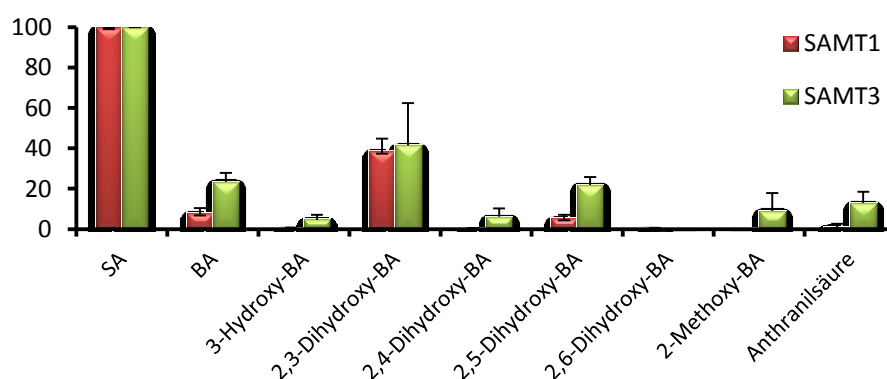


Abb. 4-3: Relative Aktivitäten der SAMT1- und SAMT3-Wildtyp-Enzyme mit den umsetzbaren Substraten, ermittelt im radioaktiven Enzymassay. Die relativen Aktivitäten sind auf den maximalen Umsatz mit SA bezogen. n=2

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in den Spektren, welche mit Rohextrakten, Kulturen überexprimierter Proteine und aufgereinigter Proteine ermittelt wurden. So konnten im

Rohextrakt Methylierungsprodukte von Jasmonsäure und verschiedenen Zimtsäurederivaten nachgewiesen werden (Pott 2003). Das Spektrum der aufgereinigten Proteine war deutlich kleiner. Die im Blüten-Rohextrakt nachweisbaren Methylester von SA und 2-Methoxy-BA könnten auf die Funktion der SAMT1 bzw. SAMT3 zurückgeführt werden. Das Vorhandensein von Methyl-Jasmonat und Zimtsäuremethylestern ließ das Vorhandensein weiterer Methyltransferasen in den Blüten vermuten, da diese Produkte nicht durch die SAMT1 und 3 synthetisiert werden konnten. Das Vorhandensein zahlreicher SABATH-Methyltransferasen konnte in den Genomen von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* gezeigt werden (Chen *et al.* 2003, Zhao *et al.* 2008). Mit 24 bzw. 41 Mitgliedern besaßen diese Pflanzen eine große Zahl durch Genduplikation entstandener Gene dieser Gruppe von Methyltransferasen.

Unterschiede im Substratumsatz konnten auch methodisch begründet sein. So wurden im radioaktiven Enzymtest verschiedene Puffer benutzt. Zum einen Tris/HCl pH 7,5, 25 mM KCl (Pott 2003) sowie HEPES pH 6,8 (Heidebrecht 2005). In einer Untersuchung der optimalen Reaktionsbedingungen zeigten sich höchste Aktivitäten im HEPES-Puffer mit einem pH von 6,8. Mit Tris-Puffern wurden geringere Aktivitäten erzielt (Heidebrecht 2005). Das konnte erklären, warum bei Pott 2005 im Enzymtest, welcher mit Tris-Puffern durchgeführt wurde, nur die Metylester von SA und BA nachgewiesen werden konnten. Beim Test der Aktivitäten in Rohextrakten war ein Einfluss von anderen Proteinen und Metaboliten nicht abschätzbar, was eine Vergleichbarkeit mit dem angereinigten Enzym erschwerte.

Ebenso konnte der His-Tag des rekombinanten Proteins bzw. die Lokalisation des Tags Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms haben. Durch die Nutzung der pET101/D-TOPO- und pET151/D-TOPO-Vektoren waren die rekombinanten Enzyme jeweils mit einem C- oder N-terminalen His-Tag versehen. Das entstandene Fusionsprotein des pET101/D-TOPO-Vektors besaß C-terminal des Enzyms einen Anhang von 32 AS (3,6 kDa), dem Protein des pET151/D-TOPO-Vektors war ein Peptid von 38 AS (3,8 kDa) vorgeschaltet. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl ein C-terminaler als auch ein N-terminaler His-Tag negativen Einfluss auf die Faltung und kinetischen Eigenschaften von Enzymen ausüben konnten (Freydank *et al.* 2008, Thielges *et al.* 2011). Im Falle der SAMT1 kamen beide Vektoren zum Einsatz, was eine Bewertung des Einflusses der His-Tags auf die Aktivität zuließ. Beide Enzyme zeigten vergleichbare Spektren und konnten SAe mit ca. 400 pkat*mg⁻¹ umsetzen. Es konnte somit kein Einfluss der Lokalisation des His-Tags auf die Enzymaktivität nachgewiesen werden.

4.3. Substrat-Spezifitäten hergestellter SAMT-Mutanten

Nach der Untersuchung der Wildtyp-Enzyme folgte die Analyse der hergestellten Mutanten. Dabei konnten die Substratspektren und enzymkinetischen Parameter der SAMT1-Mutanten Leu216Met und Met156His+Leu216Met sowie der SAMT3-Mutanten Met156His, Val231Ile, Val231Phe und Phe357Tyr ermittelt werden. Die Auswirkungen der eingefügten Mutationen auf diese Eigenschaften wurden im Folgenden diskutiert.

SAMT3 Met156His

Alle charakterisierten SAMT-Enzyme besaßen ein Methionin an der in *H. c.* entsprechenden Position 156. Dagegen war in den BSMT-Enzymen sowie auch in den meisten anderen SABATH-Enzymen an dieser Stelle ein Histidin zu finden. Dazu gehörten die Methyltransferasen, welche spezifisch für Jasmonsäure, Nicotinsäure, Farnesensäure, 7-Methylxanthin, Zimtsäure, Indol-3-Essigsäure oder Logansäure waren (Seo *et al.* 2001, Mizuno *et al.* 2003, Pott *et al.* 2004, Yang *et al.* 2006, Kapteyn *et al.* 2007, Murata *et al.*, 2008, Hippauf *et al.* 2010). Das Histidin an dieser Position ermöglichte somit die Methylierung einer Vielzahl sehr verschiedener Substrate. Da ein Methionin nur in den für die Methylierung von SA spezialisierten Enzymen der SABATH-MTs vorkam, schien es für die Umsetzung von SA sehr wichtig zu sein. Ein Branch-Site-Test innerhalb der monophyletischen Linie der SAMT-Enzyme zeigte, dass nur dieses Methionin unter positiver Selektion stand (Barkman *et al.* 2007). Diese AS war also für die vorrangige Methylierung von SA zuständig und für die Unterscheidung von SA und BA verantwortlich. Die Besonderheit von SA liegt in seiner starren Konformation. Zwischen der Hydroxylgruppe in *ortho*-Position des Benzenrings und der Carboxylgruppe bildet sich eine intramolekulare Wasserstoffbrücke aus. Durch diese ist das Molekül planar, d.h. die Carboxylgruppe ist nicht mehr frei drehbar. Die Methionin-Molekülklammer der aktiven Zentren aller SAMTs fixieren das planare SA und richten es genau zum Methylgruppendonator aus (Zubieta *et al.* 2003). Ist BA nicht oder an anderer Position mit einer Hydroxyl- oder Methoxygruppe substituiert, existiert diese intramolekulare Wasserstoffbrücke nicht und die Carboxylgruppe am Benzolring ist frei drehbar. Das führt in den SAMT zu einer deutlich verminderten Umsetzung dieser Substrate. Ebenso bietet ein Histidin an dieser Position einen potentiellen Partner für eine Wasserstoffbrücke, was im Falle einer Bindung mit einer Hydroxylgruppe die korrekte Ausrichtung des Substrates verhindern oder erschweren kann (Abb. 4-4).

Phylogenetische Untersuchungen haben ergeben, dass das Methionin erst mit der Entstehung der SAMT an dieser Position auftauchte und ursprüngliche Gene mit großer Wahrscheinlichkeit eine Histidin besaßen (Huang *et al.* 2012, im Druck). Dafür sprechen die

weite Verbreitung des Histidin in den weniger eng verwandten Enzymen und das einzigartige Auftreten des Methionin an der entsprechenden Position in der SAMT.

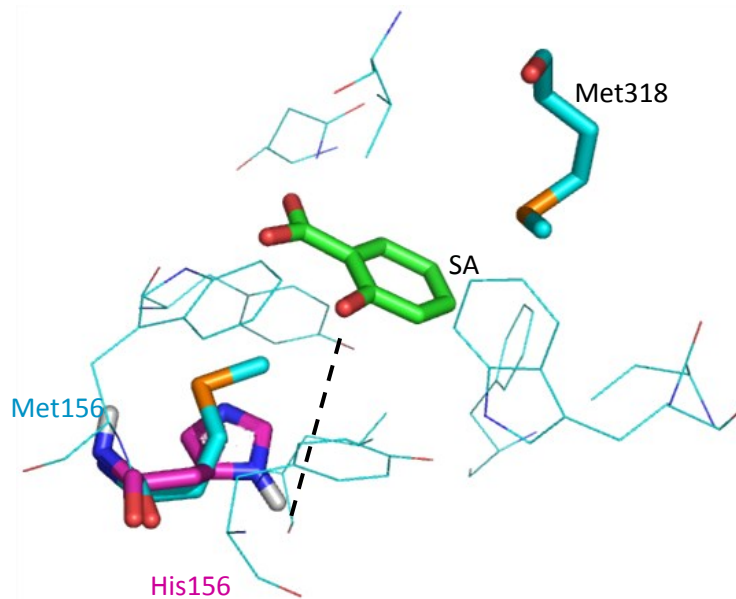


Abb. 4-4: Computermmodell der für die Substratbindung verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3. Met156 (türkis) wurde durch His (pink) ersetzt. Met156 und Met318 bilden eine Molekülklammer zur Fixierung von SA (grün). Die gestrichelte Linie markiert eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen His156 und SA. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano, 2002, www.pymol.org).

Auch die Ergebnisse der Mutagenese der *H. c.* SAMT bestätigten die Bedeutung des Methionin. Die Mutation Met156His führte im Vergleich zum Ausgangsenzym SAMT3 zu einer verminderten Spezifität für SA, die mit ca. 50%-iger Effizienz umgesetzt wurde. Die absolut gebildeten Mengen an MSA und MBA waren innerhalb ihrer Schwankungsbreite auf gleichem Level, wobei die Tests im Medium des Expressionsstammes bei gleichzeitiger Zugabe von SA und BA die bevorzugte Umsetzung von SA bestätigten. Obwohl der K_M -Wert für SA um den Faktor 15 geringer war als der für BA, besaß die Mutante eine höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit und Wechselzahl mit BA, wodurch die katalytische Effizienz mit BA an die mit SA heranreichte. Im Vergleich zur SAMT3 verringerte sich die katalytische Effizienz der Mutante mit BA um den Faktor drei, mit SA jedoch deutlich stärker um den Faktor acht, was in einer gesteigerten Aktivität mit BA mündete. Die Met156His-Mutante erwarb im Vergleich zur SAMT3 eine größere Akzeptanz für weitere Substrate, sie konnte zusätzlich 4-Hydroxy-BA, 3,5-Dihydroxy-BA und Nicotinsäure methylieren. Die verbesserten absoluten Aktivitäten mit BA (x 1,5), Anthranilsäure (x2), 3-Hydroxy-BA (x5) und 2-Methoxy-BA (x2) ergaben für die Mutante ein Substratspektrum, welches sich denen der BSMT-Enzyme annäherte. Dafür sprach neben dem verminderten Umsatz von SA auch die geringere Aktivität mit 2,3-, 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA (Abb. 4-5, Spektren 1 und 2).

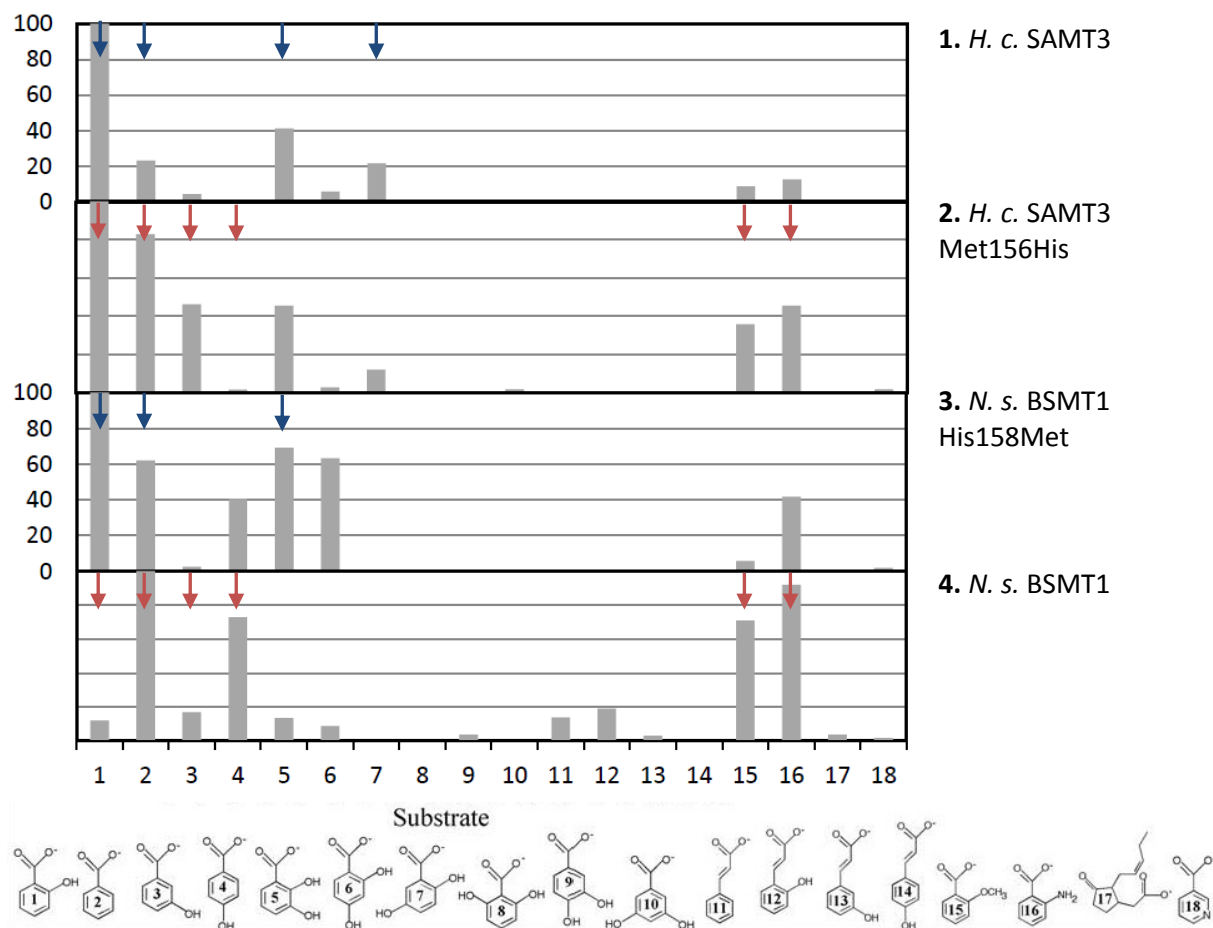


Abb. 4-5: Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT3 (1) und der *H. c.* SAMT3-Mutante Met156His (2), der *N. s.* BSMT1 (4) und der *N. s.* BSMT1-Mutante His158Met (3) mit den 18 getesteten Substraten. Bevorzugt umgesetzte Substrate sind mit Pfeilen markiert (SAMT, blau; BSMT, rot) Die relativen Aktivitäten der *N. s.* BSMT1 entstammen Feike 2007.

Das Phänomen ließ sich dadurch erklären, dass die Auflösung der in SAMT konservierten Molekülklammer aus zwei Methionin-Resten eine exakte Ausrichtung in *ortho*-Position hydroxylierter Substrate erschwerte. Zwar wurde das Methylierungsprofil durch die Mutation deutlich in Richtung BSMT verschoben (Abb. 4-5, Spektrum 2), doch blieb die maximale Aktivität mit SA erhalten. Im Falle der bereits untersuchten *N. s.* BSMT1 gelang dagegen mit der Mutation Richtung SAMT (His158Met) eine Veränderung der Substratspezifität (Feike 2007). Die Mutante bevorzugte SA als Substrat. Auch in Bezug auf weitere Substrate fand eine Veränderung in Richtung SAMT statt. So wurden 2,3- und 2,4-Dihydroxy-BA in der *N. s.* BSMT1-Mutante His158Met im Vergleich zum Wildtyp mit höherer Effektivität umgesetzt. Die spezifische Aktivität mit SA erhöhte sich um das Vierfache, die mit 2,3- und 2,4-Dihydroxy-BA um das Zwei- bis Dreifache (Abb.4-5, Spektren 3 und 4). Die spezifischen Aktivitäten mit den BSMT-typischen Substraten BA, 3- und 4-Hydroxy-BA, Anthranilsäure und 2-Methoxy-BA verringerten sich deutlich im Vergleich zum Wildtyp.

Mutagenese-Experimente an der CCMT (engl. cinnamate/p-coumarat methyltransferase) aus *Ocimum basilikum* (*O. b.*) belegten die Bedeutung des Methionin für die Methylierung von SA (Kapteyn *et al.* 2007). Dieses Enzym dient der Produktion der Methylester von Zimtsäure und p-Coumarsäure, welche als Duftstoffe in der Pflanzen-Insekten-Interaktion von Bedeutung sind (Hattori *et al.* 1992, Daayf *et al.* 2000, Scalliet *et al.* 2008) und Schlüsselsubstanzen des Duftes verschiedener Basilikumvarianten und –chemotypen darstellen (Kapteyn *et al.* 2007). Die CCMT war in der Lage, neben (*E*)-Zimtsäure (100 %), Hydro- und 4-Hydroxy-Zimtsäure sowie *para*- und *meta*-Coumarsäure auch BA mit einer relativen Aktivität von 7,8 % umzusetzen. SA konnte von diesem Enzym nicht methyliert werden. Zur Unterstützung der Hypothese der Ausbildung der Molekülklammer aus zwei Methionin-Resten im aktiven Zentrum der *C. b.* SAMT (Zubieta *et al.* 2003) wurde eine entsprechende Mutante in der *O. b.* CCMT1 (His160Met) erzeugt und hinsichtlich ihrer Substratspezifität untersucht. Die Substitution von His160 zu Methionin führt zu einer stark erhöhten Aktivität mit BA (161,9 %) und einer zusätzlichen Methylierung von SA und Anthranilsäure (61,1 % und 20,5 %). Das Ergebnis bewies in diesem Fall, dass die Einführung des Methionin Bedingung und ausreichend war, um SA nutzbar zu machen. Dockingexperimente führten zu der Erklärung, dass durch das Methionin anstelle des Histidin keine Wasserstoffbrücke zur *ortho*-Hydroxyl-Gruppe von SA aufbaut werden konnte, wodurch die intramolekulare H-Brücke erhalten blieb und eine ideale Ausrichtung der SA zum Methylgruppendonator ermöglichte (Kapteyn *et al.* 2007).

Ein ähnlicher Versuch an der Anthranilsäure-Methyltransferasen 1 aus *Zea mays* (*Z. m.*) zeigte jedoch, dass das Methionin nicht immer ausreichte, eine Umsetzung von SA zu gewährleisten (Köllner *et al.* 2010). Die *Z. m.* AAMT1 katalysiert die Bildung von O- und N-Methyl-Anthranilat. Methylanthranilat ist Bestandteil des Blütenduftes von Vertretern der *Orchidaceae* und *Rutaceae* (Knudsen *et al.* 2006) und wird von den Blättern der Maispflanze nach Beschädigung durch Herbivoren emittiert. Das vom Blatt emittierte Duftgemisch dient der Anlockung von Feinden der Herbivoren (Köllner *et al.* 2010). Trotz der strukturell sehr ähnlichen Substrate SA und Anthranilsäure und der hohen Sequenzidentität der AAMT mit SAMT- und BSMT-Enzymen wies die *Z. m.* AAMT1 keine Aktivität mit SA und nur eine geringe Aktivität mit BA auf. Ein Austausch von Glutamin an der Position 167 zu Histidin bzw. Methionin führte jedoch nicht zur erhofften Umsetzung von SA. Die Mutante Gln167His zeigte einen verbesserten Umsatz von BA im Vergleich zum Wildtyp. Ein entscheidender Unterschied im Vergleich zur Konsensussequenz des aktiven Zentrums der SAMT (*C. b.* SAMT) lag im Tyr246 der AAMT1, welches die Bindung von SA verhindern könnte. Das Modell der aktiven Tasche zeigte eine Verkleinerung der Substratbindestelle durch das

Tyrosin, wodurch die SA-Hydroxylgruppe räumlich behindert wurde. Für die korrekte Orientierung von Anthranilsäure schien diese Konformation wichtig, die Umsetzung von SA wurde jedoch verhindert. Erst der Austausch dieser AS gegen ein Tryptophan, welches in den SAMT-Enzymen hoch konserviert ist, ermöglichte der AAMT1 die Methylierung von SA. Die Mutante war in der Lage SA mit einer 13 %-igen relativen Aktivität umzusetzen (Köllner *et al.* 2010).

Entsprechend der *H. c.* SAMT3-Mutante Met156His wurde bereits in früheren Arbeiten versucht, die Spezifitäten für SA/BA zu verändern. In der SAMT aus *Datura wrightii* wurde Met156 gegen Histidin ausgetauscht, um einen besseren Umsatz von BA zu erreichen. In der Tat bewirkte die Substitution einen deutlich verbesserten Umsatz von BA. Im Vergleich zum Wildtyp, welcher bevorzugt SA umsetzte, produzierte die Mutante Met156His bei gleichzeitiger Zugabe beider Substrate vergleichbare Mengen an MSA und MBA. (Barkman *et al.* 2007). Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei der Mutagenese der *C. b.* SAMT erzielt werden (Zubieta *et al.* 2003). Zwar war das Ziel dieser Arbeit, die SAMT in Richtung JMT zu verändern, doch wirkte sich die eingefügte Mutation Met150His in ähnlicher Weise aus. So wurde die relative Aktivität des Enzyms mit BA von 11% auf 23 % gesteigert. Auch die Methylierungsaktivität mit 3- und 4-Hydroxy-BA erhöhte sich im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Die relativ großen Substrate Jasmonsäure und Zimtsäure wurden deutlich besser umgesetzt, was für eine entsprechende Vergrößerung des aktiven Zentrums sprach (Zubieta *et al.* 2003).

SAMT1 Leu216Met

Eine weitere hoch konservierte AS innerhalb der SAMT-Enzyme stellte Leu216 dar, was schon früh zu der Vermutung führte, dass Leucin an der Position 216 (*H. c.*) für die Unterscheidung von SA und BA von Bedeutung ist (Effmert *et al.* 2005). Im Gegensatz zur SAMT besitzen Enzyme der BSMT-Gruppe an dieser Position ein Methionin oder Isoleucin. Auffallend ist auch, dass die Multisubstratenzyme, die *S. f.* SAMT sowie die *N. s.* BSMT1, an dieser Position ein Methionin aufweisen. Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass ein Methionin einen Beitrag zur Methylierung eines großen Spektrums chemisch ähnlicher Substanzen leistet.

Die Ergebnisse der AS-Substitution von Leucin zu Methionin an der Position 216 im aktiven Zentrum der *H. c.* SAMT zeigten keine Änderung der Substratspezifität für SA. Das Substratprofil der Mutante Leu216Met wies im Vergleich zur SAMT1 nur geringfügige Unterschiede auf. Die spezifischen Aktivitäten mit SA und BA lagen mit 70 und 77 % unter denen des Wildtyps. Die K_M -Werte für SA und BA sanken im Vergleich zur SAMT1 um den

Faktor 1,8 und 20,6, die katalytischen Effizienzen stiegen in beiden Fällen an (SA x 1,8, BA x 7). Die katalytische Effizienz für SA war mit $11 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ um den Faktor 41 größer als für BA ($0,27 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). Die Werte lagen im für SAMT typischen Bereich, wonach die katalytischen Effizienzen für SA 39-76-mal höher als für BA waren (Effmert *et al.* 2005). Im Substratspektrum der Mutante Leu216Met hatte sich nur die relative Aktivität mit 2,3-Dihydroxy-BA im Vergleich zur SAMT1 verbessert. Insgesamt verkleinerte sich das Substratspektrum um die Substanzen 3-Hydroxy-BA, 2,4-Dihydroxy-BA und 2,6-Dihydroxy-BA, deren Methylester nicht nachweisbar waren.

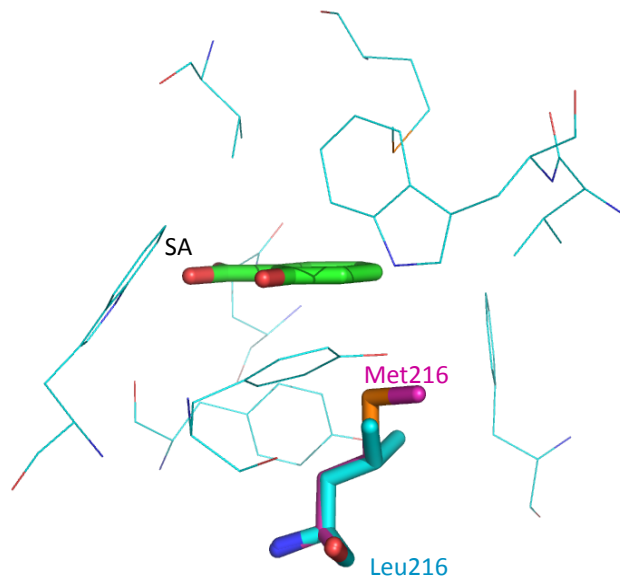


Abb. 4-6: Computermodell der für die Substratbindung (SA, grün) verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT1. Leu216 (türkis) wurde durch Met (pink) ersetzt. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

Die entgegengesetzte Mutation der *N. s.* BSMT1 Met218Leu ergab im Hinblick auf SA und BA ebenfalls keine Veränderung der Spezifität. Der Austausch führte jedoch zur besseren Umsetzung von Zimtsäure, 2-Hydroxy-Zimtsäure sowie Jasmonsäure, was eine Vergrößerung des aktiven Zentrums nahe legte (Feike 2007). Die Ergebnisse sprachen dafür, dass ein Methionin oder Leucin an dieser Stelle im aktiven Zentrum lediglich eine Wirkung auf die Größe des aktiven Zentrums hatte. Ein Leucin bot den Substraten mehr Platz als das entsprechende Methionin (Abb. 4-6). Dies stand im Gegensatz zu der von Effmert *et al.* 2005 erstellten Hypothese, nach der ein Methionin, wie in den Multisubstratenzymen, die Methylierung vieler verschiedener Substrate ermöglicht. Auf eine typische SAMT schien diese Aussage nicht übertragbar zu sein und die Bedeutung einer bestimmten AS konnte nur im Zusammenhang mit dem Aufbau des gesamten aktiven Zentrums betrachtet werden. So

besaßen die Multisubstratenzyme *S. f.* SAMT und *N. s.* BSMT1 neben dem Methionin an der Position 218/216 ebenso ein Leucin an der Position 234/232, was sie von anderen Mitgliedern der SAMT/BSMT-Gruppe unterschied. Es war also möglich, dass diese AS nur im Zusammenspiel das große Substratspektrum bewirkten. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da es nicht gelang, die entsprechende Mutante der *H. c.* SAMT Leu216Met+Trp232Leu zu gewinnen. Die Überexpression der *H. c.* SAMT1 mit den entsprechenden Mutationen führte zu einem unlöslichen Protein, was dafür sprach, dass die eingefügten Mutationen wahrscheinlich zu einer fehlerhaften Faltung des Enzyms führten. Da auch in der Überexpressions-Kultur nach Substratzugabe kein Produkt gewonnen werden konnte, war anzunehmen, dass die Faltung des Proteins nicht erst bei der Aufreinigung verändert wurde, sondern schon in der *E. coli*-Zelle nicht korrekt gefaltet werden konnte. Bereits der einfache Austausch von Trp232Leu hatte eine negative Wirkung auf die Aktivität des Proteins. Obwohl geringe Mengen der Trp232Leu-Mutante nach der Aufreinigung in Lösung vorlagen, war keine Aktivität dieser Mutante nachweisbar. Das Tryptophan an der Position 232 schien somit essenziell für die Aktivität der SAMT zu sein. Dafür sprach auch, dass die AS in den SAMT stark konserviert ist und die *S. f.* SAMT hier eine Ausnahme bildet. Ein entsprechender Austausch in der *N. s.* BSMT1 Leu234Trp führte zwar zu ausreichend löslichem Protein, welches jedoch keinerlei Aktivität zeigte. Das Ergebnis wurde so gedeutet, dass das Tryptophan die Struktur des aktiven Zentrums so veränderte, dass Substrate keinen Zugang mehr bekamen (Feike 2007). In der *H. c.* SAMT1 konnten auch zusätzliche Mutationen die negative Wirkung der Tryptophan-Substitution nicht aufheben bzw. abmildern. Alle Mutanten mit diesem Austausch waren unter den gewählten Bedingungen unlöslich, d.h. wahrscheinlich falsch gefaltet und inaktiv.

SAMT1 Met156His+Leu216Met

Diese Doppelmutation an den Positionen 156 und 216 der *H. c.* SAMT1 führte zu einer Sequenz, die bezogen auf diese AS der *N. s.* BSMT1 glichen. Wie in der Abbildung 4-8 zu sehen, führte die alleinige Mutation von Leu216 zu Methionin nicht zur Änderung des Enzymtyps. Nur die typischerweise von der SAMT gut umgesetzte 2,3-Dihydroxy-BA wurde mit geringerer Aktivität umgesetzt. Die zusätzliche Substitution von Met156 in Histidin führte jedoch zu einem Substratprofil, welches den BSMT-Enzymen entsprach (Abb. 4-8, Spektrum 3). So erlangte die Doppelmutante der SAMT1 die höchste Aktivität mit BA. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante mit BA wurde im Vergleich zur Leu216Met-Mutante um das 44-fache gesteigert, wogegen sich die Effizienz mit SA nur verdreifachte. Mit 33,8 und 11,94 s⁻¹M⁻¹ lagen die katalytischen Effizienzen für SA und BA dicht zusammen

(Tab. 3-9). Gleiches konnte für die K_M -Werte beobachtet werden, die bei 106 μM für SA und 221 μM für BA lagen. Da in der Bakterienkultur von dieser Mutante BA bevorzugt methyliert wurde und auch die relative Aktivität mit BA am größten war, schien der Faktor 2-3 zwischen den K_M -Werten und katalytischen Effizienzen zu klein, um nach diesen Parametern eine Zuordnung zur SAMT bzw. BSMT vorzunehmen. SAMT-typische K_M -Werte lagen für SA zwischen 24 und 250 μM für BA zwischen 1,3 und 2,9 mM (Effmert *et al.* 2005). Die *H. c.* SAMT1 zeigte sogar einen deutlich höheren K_M für BA von 20,6 mM (Krohn 2005). Durch die doppelte Mutation wurde der K_M -Wert für BA nahezu dem für SA angeglichen. Das Substratspektrum der Doppelmutante entsprach dem einer typischen BSMT, denn neben der maximalen Aktivität mit BA, konnte das Enzym Anthranilsäure und 2-Methoxy-BA mit mindestens 20 %-iger Aktivität methylieren. Ebenso erlangte die Doppelmutante die Fähigkeit, 3- und 4-Hydroxy-BA umzusetzen, welche von der SAMT1 nicht nutzbar waren (Abb. 4-8, Spektren 1 und 3).

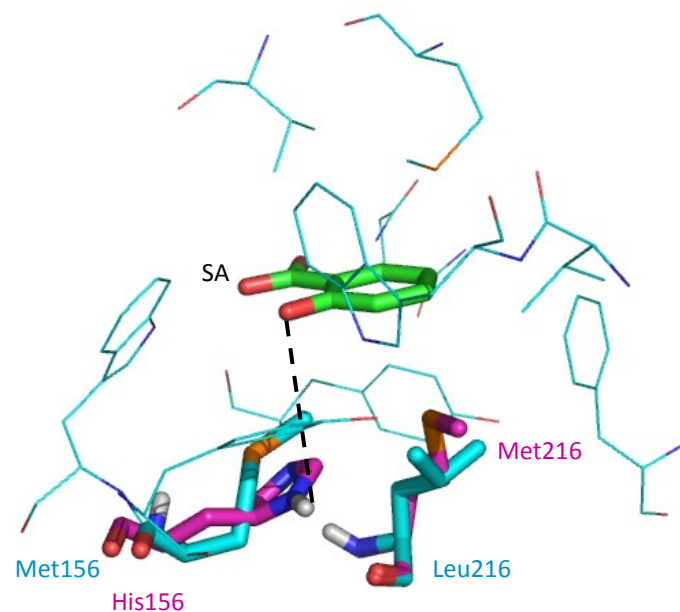


Abb. 4-7: Computermodell der für die Substratbindung (SA, grün) verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT1, Met156 und Leu216 (türkis) wurden durch His und Met (pink) ersetzt. Die gestrichelte Linie markiert eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen His156 und SA. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org)

Das Modell der SA-Bindestelle im aktiven Zentrum der SAMT1 zeigte, dass die Struktur der Tasche durch die zweifache Mutation deutlich verändert wurde (Abb. 4-7). So schien im Bereich der AS 216 der Raum für das Substrat verringert, andererseits im Bereich der AS 156 vergrößert. Dadurch wurde zum einen die Architektur der hydrophoben Tasche für die Substratbindung verändert. Andererseits wurde an dieser Stelle durch das Histidin ein potentieller Protonendonator für eine Wasserstoffbrücke geliefert. Bildete sich eine

Wasserstoffbrücke zur *ortho*-Hydroxylgruppe der SA aus, würde die intramolekulare Wasserstoffbrücke des SA aufgelöst. Ebenso könnte die Brücke das Substrat in eine für die Methylgruppenübertragung ungünstigere Position bringen. Dafür sprach, dass die Mutanten mit einem Histidin an dieser Position deutlich schlechter die getesteten *ortho*-hydroxylierten BA-Derivate umsetzten (Abb. 4-8, Spektrum 3).

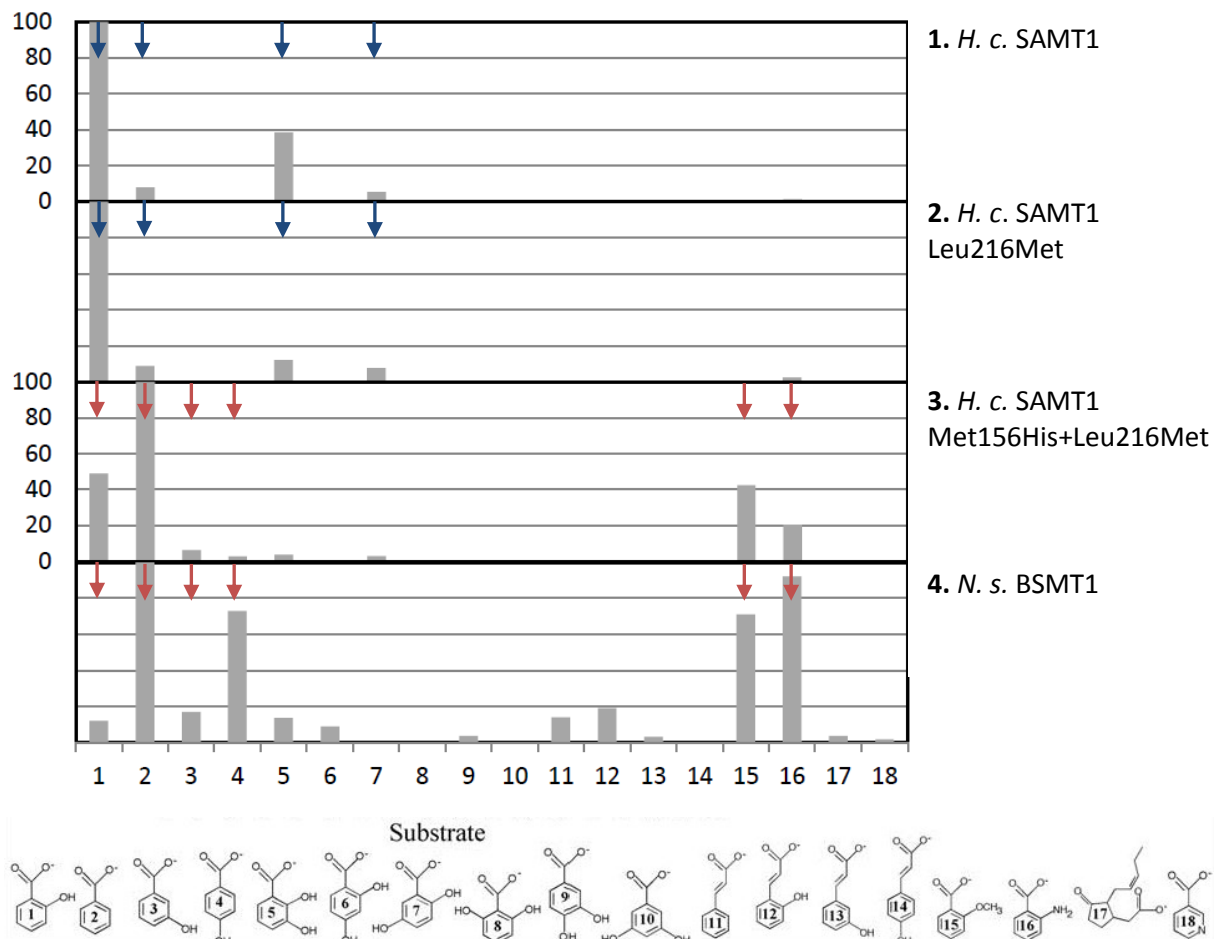


Abb. 4-8: Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT1 (1), der *H. c.* SAMT1-Mutanten Leu216Met (2) und Met156His+Leu216Met (3) und der *N. s.* BSMT1 (4) mit den 18 getesteten Substraten. Bevorzugt umgesetzte Substrate sind mit Pfeilen markiert (SAMT, blau; BSMT, rot) Die relativen Aktivitäten der *N. s.* BSMT1 entstammen Feike 2007.

SAMT3 Val231Ile

Die Konsensus-Sequenz (*C. b.* SAMT) wies an der dem Val231 in der *H. c.* SAMT1 und 3 entsprechenden Position ein Isoleucin auf. Die AS könnte somit für eine optimale Umsetzung von SA mit verantwortlich sein. Da es aber auch SAMTs mit abweichenden AS (*H. c.*, *N. tabacum*: Val, *S. f.*: Ala) an dieser Position gab und auch in einigen BSMTs ein Isoleucin an

dieser Position vorkam (*N. s.* BSMT1, *A. majus* BAMT), besaß diese AS vermutlich keine Bedeutung für die Diskriminierung von SA und BA.

Durch die Einführung der Val231Ile-Substitution in die *H. c.* SAMT3 veränderte sich das Substratspektrum nur geringfügig. Die Mutante zeigte das Profil einer typischen SAMT, wobei allein die Aktivität mit 2,3-Dihydroxy-BA deutlich anstieg. Die relativen Aktivitäten mit den umgesetzten Substraten entsprachen der *H. c.* SAMT3. In geringem Umfang konnte nun 2,6-Dihydroxy-BA umgesetzt werden (0,6% relative Aktivität). Die spezifischen Aktivitäten dieser Mutante mit SA, BA, 2-Methoxy-BA, 2,3- und 2,5-Dihydroxy-BA waren im Vergleich zur *H. c.* SAMT3 um den Faktor 1,6 bis 2,7 erhöht. Da die Aktivitäten mit SA und BA gleichermaßen erhöht waren, zeigte das Isoleucin an der Position keinen Einfluss auf die Diskriminierung dieser Substrate. Die enzymkinetischen Parameter dieser Mutante entsprachen denen einer typischen SAMT (Effmert *et al.* 2005). Der K_M -Wert für SA von 40 μM lag im unteren Bereich der SAMTs (24-250 μM), der K_M für BA war mit 1,4 mM um den Faktor 36 höher. Die katalytische Effizienz für BA war mit $0,48 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ um den Faktor 130 geringer als für SA ($63,33 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$).

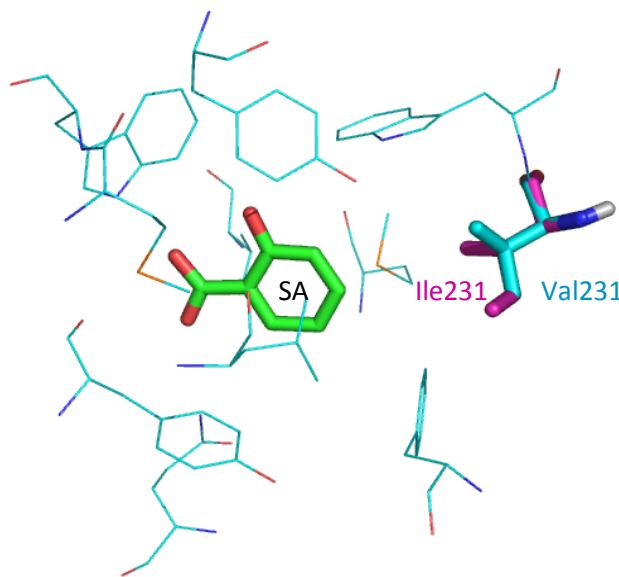


Abb. 4-9: Computermodell der für die Substratbindung (SA, grün) verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3. Val231 (türkis) wurde durch Ile (pink) ersetzt. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

Das Modell des aktiven Zentrums (Abb. 4-9) zeigte, dass die Struktur der aktiven Tasche der Mutante Val231Ile nur geringfügig verändert wurde. Die unpolare AS Isoleucin war um eine Methylgruppe größer als Valin, wodurch sie das Volumen der aktiven Tasche etwas verkleinerte.

SAMT3 Val231Phe

Die BSMTs aus *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* wiesen ein Phenylalanin an der dem Val231 in der *H. c.* SAMT1 und 3 entsprechenden Position auf. Diese Enzyme besaßen ein kleines Substratspektrum und konnten neben BA und SA zusätzlich nur ein bis zwei Substrate umsetzen (Chen *et al.* 2003). Die große AS Phenylalanin konnte somit den Zugang zum aktiven Zentrum limitieren.

Im Vergleich zur *H. c.* SAMT3 konnte die Mutante Val231Phe deutlich weniger Substrate umsetzen. Das große aromatische Phenylalanin bewirkte, dass nur noch in *ortho*-Position hydroxylierte BA-Derivate methyliert werden konnten. Es wurden also nur noch Derivate umgesetzt, die eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylgruppe und der *ortho*-Hydroxylgruppe ausbildeten. Die vom Wildtyp nutzbaren Substrate BA, 3-Hydroxy-BA, 2-Methoxy-BA und Anthranilsäure konnten nicht mehr methyliert werden. Diese Substrate besaßen die Gemeinsamkeit, dass der aromatische Ring um die Carboxylgruppe frei drehbar war und somit vermutlich nicht mehr in das verkleinerte aktive Zentrum passte (Abb. 4-10).

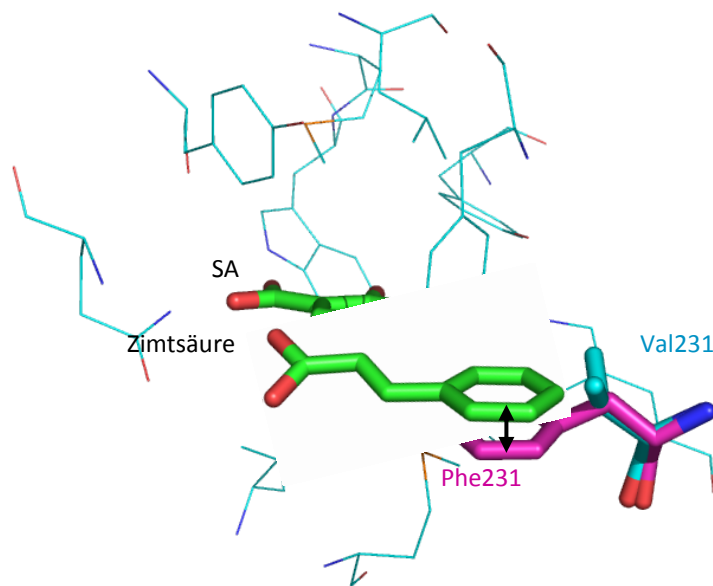


Abb. 4-10: Computermodell der für die Substratbindung (SA, grün) verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3. Val231 (türkis) wurde durch Phe (pink) ersetzt. Der Pfeil zeigt eine mögliche π - π -Wechselwirkung zwischen den Aromaten an. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass aromatische Verbindungen ohne fixierte Carboxylgruppe mit dem Phenylalanin in π - π -Wechselwirkungen traten und dadurch vom aktiven Zentrum ferngehalten wurden. Diese Hypothese wurde dadurch gestützt, dass von dieser Mutante Zimtsäure umgesetzt werden konnte. Diese besaß eine frei drehbare

Kohlenwasserstoffkette, welche jedoch deutlich länger als bei der BA war und die Carboxylgruppe in die Nähe des Methylgruppendonors brachte bzw. auch in das verengte aktive Zentrum passte (Abb. 4-10). Die spezifischen Aktivitäten mit den nutzbaren BA-Derivaten waren bei der Mutante Val231Phe deutlich verringert, sie lagen zwischen 5 % (2,5-Dihydroxy-BA) und 65 % (SA) im Vergleich zur *H. c. SAMT3*. Der K_M -Wert für SA stieg im Vergleich zur *H. c. SAMT3* stark an (Mutante: 1,4 mM, *SAMT3*: 123 mM). Auch die katalytische Effizienz mit SA sank deutlich von $278,1 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (*SAMT3*) auf $9,02 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ in der Mutante. Die Mutante zeigte somit eine deutlich verringerte Umsetzungs-Effizienz mit SA.

SAMT3 Phe357Tyr

Die Enzyme der BSMT-Gruppe besaßen an der der *H. c. SAMT1/3* entsprechenden Position 357 eine polare AS, wohingegen die SAMT-Enzyme an dieser Stelle ein Phenylalanin aufwiesen. Das ließ die Vermutung zu, dass diese AS für die Unterscheidung von SA und BA von Bedeutung war (Effmert *et al.* 2005). Die Mutation Phe357Tyr in der *H. c. SAMT3* führte allerdings zu keiner Spezifitätsänderung. Die relativen Aktivitäten mit SA und BA blieben unverändert. Die spezifischen Aktivitäten waren nur geringfügig verringert. Die verbesserte Umsetzung von 2,4- und 2,5-Dihydroxy-BA sowie die verringerte Aktivität mit 3-Hydroxy-BA, Anthranilsäure sowie der Verlust der Aktivität mit 2-Methoxy-BA verändern das Substratspektrum der SAMT3-Mutante in Richtung typischer SAMT (Abb. 4-12, Spektrum 2). Die *H. c. SAMT3* zeigte für BA einen relativ niedrigen K_M von 156,5 μM . Dieser war nur um den Faktor zwei größer als der K_M der *H. c. SAMT3* für SA (62 μM). Durch die Mutation Phe357Tyr wurde der K_M für BA deutlich größer und lag mit 2,2 mM im für SAMT-Enzyme typischen Bereich (1,3-2,9 mM, Effmert *et al.* 2005). Das Tyrosin an der Position 357 führte nicht zur Veränderung der *H. c. SAMT3* in Richtung BSMT, sondern verstärkte eher die SAMT-Eigenschaften. In der *N. s. BSMT1* bewirkt die umgekehrte Mutation Ser344Phe eine etwas bessere Umsetzung von SA und verringerte Methylierung von BA im Vergleich zum Wildtyp (Feike 2007). Die Wirkung war jedoch recht unspezifisch, denn es wurden auch 2-Methoxy-BA, 2,4-Dihydroxy-BA, Zimtsäure und Jasmonsäure besser umgesetzt. Das Phenylalanin schien somit eine Selektion von SA nur in Verbindung mit anderen AS des aktiven Zentrums zu unterstützen. Wurde das Phenylalanin durch die polare AS Serin ersetzt, waren die Bildung von MSA und MBA nur in der Überexpressions-Kultur nachweisbar. Die spezifischen Aktivitäten mit den Substraten konnten im Enzymtest nicht nachgewiesen werden. Die Substitution von Phenylalanin gegen Threonin führte zum fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität, es konnten nur kleinste Mengen an MSA im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Mutationen an dieser Position zeigten, dass eine Veränderung

der Polarität einer AS durchaus unterschiedliche Wirkungen haben können. Zwar besaßen die AS Serin, Threonin und Tyrosin im Vergleich zum Phenylalanin eine Hydroxylgruppe, doch schien an dieser Position ein zusätzlicher Phenolring, wie durch Tyrosin realisiert, wichtig für den Substratumsatz zu sein. So wirkte sich der Verlust der phenolischen Komponente deutlich negativer auf die Umsetzung von SA aus als die Einführung von Tyrosin. Die Abbildung 4-11 zeigt die räumliche Auswirkung der Mutation, die nur geringfügig ist.

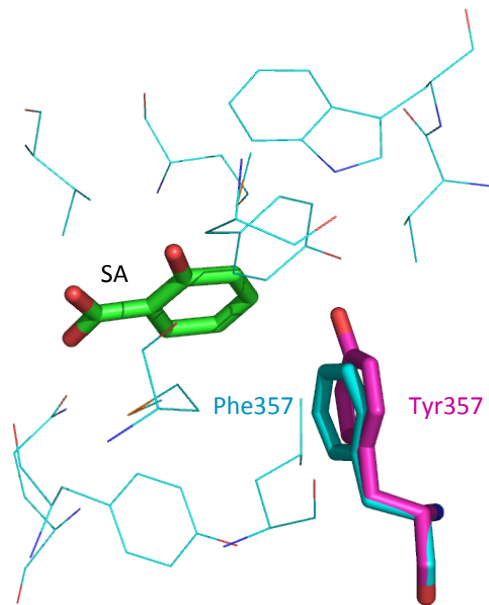


Abb. 4-11: Computermodell der für die Substratbindung (SA, grün) verantwortlichen AS der *H. c.* SAMT3. Phe357 (türkis) wurde durch Tyr (pink) ersetzt. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (DeLano 2002, www.pymol.org).

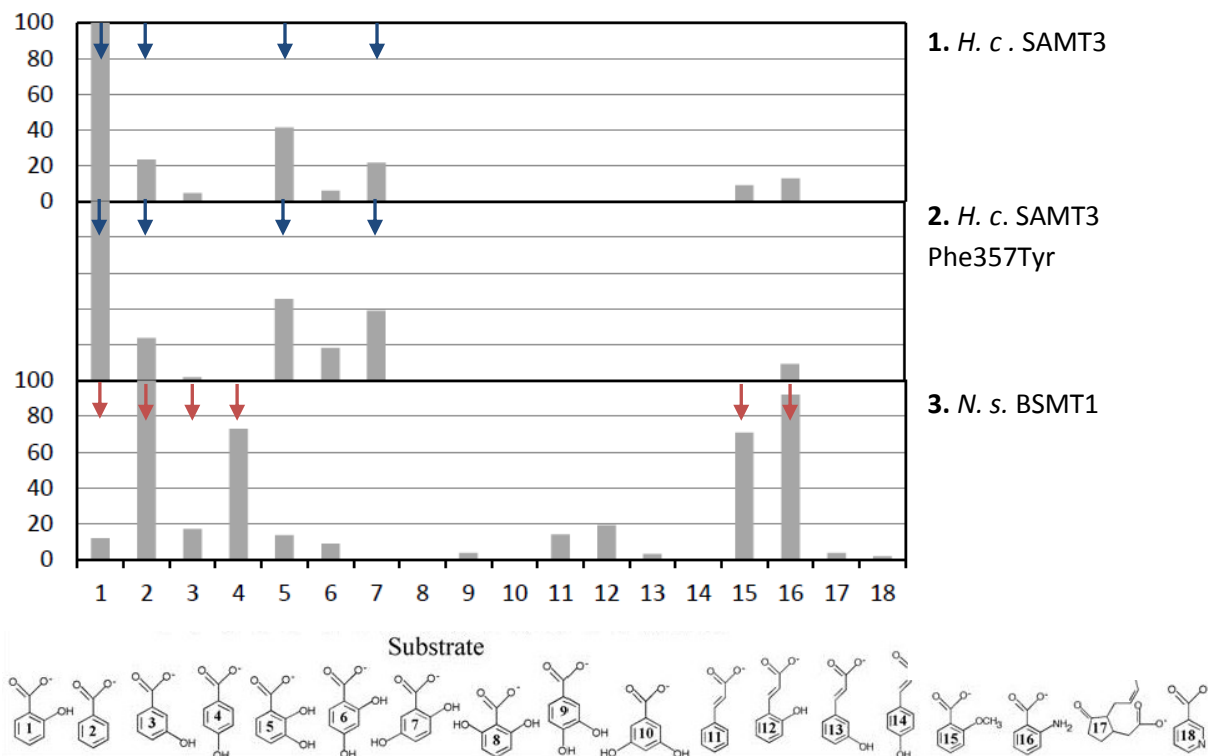


Abb. 4-12: Relative Aktivitäten der *H. c.* SAMT3 (1) und der *H. c.* SAMT3-Mutante Phe357Tyr (2) und der *N. s.* BSMT1 (3) mit den 18 getesteten Substraten. Bevorzugt umgesetzte Substrate sind mit Pfeilen markiert (SAMT, blau; BSMT, rot) Die relativen Aktivitäten der *N. s.* BSMT1 entstammen Feike 2007.

4.4. Einfluss weiterer Mutationen

Die an der *H. c.* SAMT durchgeführten Mutationen zeigten ebenfalls essentielle AS auf, deren Substitution wahrscheinlich eine korrekte Faltung des Proteins verhinderte bzw. einen Verlust der Proteinfunktion bewirkte. Neben dem bereits erwähnten Trp232 schien hier auch das Val321 innerhalb der *H. c.* SAMT1/3 nicht ersetzbar zu sein. So führten die Mutationen Val321Phe und Val321Tyr nur zu wenig oder keinem löslichen Protein. In der Überexpressionskultur waren nur geringe Mengen an Produkten nachweisbar. Auf gleiche Weise wirkte sich die Einführung von mehreren Mutationen aus. Von den SAMT1 Mutanten Met156His+Leu216Met und Met156His+Leu216Met+Phe357Thr konnten rekombinante Proteine aus der löslichen Phase gewonnen werden, jedoch hatt die Dreifachmutante keine enzymatische Aktivität mehr. Das ließ vermuten, dass die Einführung der Mutationen einen negativen Einfluss auf die Faltung und die Aktivitäten der Proteine hatte.

4.5. *In silico* Modellierung der *H. c.* SAMT

Molekulare Modellierung und Simulation gewannen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung und lieferten oft detaillierte Beiträge zur Aufklärung der Struktur und Funktion von Makromolekülen (Yang *et al.* 2003, Teuber *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2009). Sie ermöglichten das Studium von der Faltung und den Konformationsänderungen in Proteinen, ihrer Assoziation mit kleinen Molekülen oder anderen Proteinen, der Entwicklung von Wirkstoffen und vielem anderen. Ebenso diente das Modelling der Darstellung und Analyse von Enzymmechanismen (van der Kamp *et al.* 2008). Im Vergleich zu den bekannten Sequenzen wurden bisher nur wenige Proteine strukturell aufgeklärt. Hier ermöglicht die Erstellung eines Homologie-Modells ein unterstützendes Werkzeug für die Planung und Analyse biologischer Experimente. Voraussetzungen für die *in silico* Modellierung von Proteinstrukturen sind eine genaue Proteinsequenz, eine Strukturdatenbank und spezielle Computerprogramme. Da die Zahl möglicher Faltungen in der Natur limitiert ist und die dreidimensionale Struktur von Proteinen eher konserviert ist als ihre Sequenz, ist es oft möglich einer Proteinsequenz eine bekannte Struktur zuzuordnen (Arnold *et al.* 2006). Voraussetzung für die Erstellung eines Proteinmodells ist ein Sequenzvergleich der Zielsequenz mit einem verwandten Protein, dessen 3D-Struktur durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurde. Dies ermöglicht eine Identifizierung strukturell konservierter Regionen, was eine Übertragung der räumlichen Anordnung auf die Zielsequenz erlaubt. Variablen Regionen dagegen muss eine Struktur zugeordnet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Identität der Sequenzen sowie eine korrekte Sequenz-Struktur-Ausrichtung für die Qualität des Modells entscheidend sind (Ginalski 2006, Arnold *et al.* 2006). Liegt die Identität beider Sequenzen über 50 %, kann davon ausgegangen werden, dass das Modell mit ca. 1 Å Root Mean Square Deviation (RMSD) des C α sehr genau ist. Die RMSD ist ein Maß für die Strukturelle Ähnlichkeit. Proteine mit einer Sequenzidentität von 30-50 % besitzen eine Strukturidentität von mindestens 80 %, hier liegt die RMSD zwischen zwei und drei Å. Fehler treten vorrangig in den Loop-Regionen auf. Bei Sequenzidentitäten zwischen 20 und 30 % kann die strukturelle Konservierung auf bis zu 55 % fallen. Unterhalb einer Sequenzidentität von 20 % nimmt die Qualität weiter ab, was die Ungenauigkeit des entsprechenden Modells weiter vergrößert (Ginalski 2006). Zur Modellierung der *H. c.* SAMT1 diente die Kristallstruktur der *C. b.* SAMT (Zubieta *et al.* 2003). Die beiden Proteine besaßen eine AS-Sequenzidentität von 57 %. Da die AS des aktiven Zentrums innerhalb der SABATH-Methyltransferasen in stark konservierte Regionen lokalisiert sind, konnte davon ausgegangen werden, dass das rekonstruierte aktive Zentrum der *H. c.* SAMT1 korrekt aufgebaut war und einen guten Einblick in die Architektur sowie die

Ligandenbindung ermöglichte. Auch ließen Unterschiede in diesen konservierten Regionen entsprechende Auswirkungen auf die Funktion und Spezifität des jeweiligen Enzyms vermuten. Die Darstellung solcher Unterschiede war daher die biologisch relevanteste Anwendung von Homologie-Modellen (Ginalski 2006).

4.5.1. Docking von Substraten in das Modell der *H. c.* SAMT

Als unterstützende Methode zur Erklärung der Einflüsse einzelner Mutationen auf die Substratspezifität sollten verschiedene Substrate in die Modelle der *H. c.* SAMT-Enzyme durchgeführt werden. Dazu wurde die Ausrichtung der Substrate im aktiven Zentrum mit der Software GOLD simuliert (Verdonk *et al.* 2003). Zunächst sollte als positives Beispiel die *H. c.* SAMT1 mit SA gedockt werden, da diese Reaktion *in vivo* und *in vitro* nachweislich ablief. Hier konnte keine zufriedenstellende Simulation erzielt werden, da SA nicht in der für die Methylgruppenübertragung notwendigen Ausrichtung im aktiven Zentrum lag. Hier konnten verschiedene Ursachen von Bedeutung sein. Zum einen gab es nachweisliche Unterschiede bei der Nutzung von Docking-Software. So lieferten die Programme Glide, FlexX, AutoDock, eHITS, GOLD, LigandFit und FITTED 1.0 im Vergleich zur Kristallstruktur teilweise abweichende Ergebnisse (Englebienne *et al.* 2007). Ebenso konnte das Homologie-Modell eine Fehlerquelle sein. Da hierfür eine Kristallstruktur die Vorlage lieferte, war eine hohe Auflösung des Kristalls notwendig. Bei geringer Auflösung konnte möglicherweise nur die allgemeine Struktur des Proteins aufgeklärt werden. Erst bei hoher Auflösung von 1-2 Å wurde die Position der meisten Atome bestimmbar, zumindest der schweren Atome (van der Kamp *et al.* 2008). Die Kristallstruktur der *C. b.* SAMT besaß eine Auflösung von 3 Å, was laut van der Kamp 2008 keine genaue Bestimmung der räumlichen Anordnung der Atome ermöglichte. Die Optimierung der Kristallstruktur erfolgte durch die Bearbeitung der Rohdaten mit verschiedenen Computer-Programmen. Hierbei flossen auch subjektive Entscheidungen des bearbeitenden Wissenschaftlers ein, was einen weiteren Schwachpunkt der Methodik darstellt. Ebenso stellte die Struktur einen Mittelwert aller Moleküle des Kristalls über den Bearbeitungszeitraum dar. Im Ergebnis war das Auftreten unterschiedlicher Konformationen bestimmter Gruppen eines Proteins möglich. Auch bestand die Möglichkeit, dass hoch flexible Regionen wie Oberflächenloops oder terminale Regionen kristallographisch nicht aufgelöst werden konnten. So war eine Kristallstruktur nicht als Struktur eines einzelnen Moleküls zu betrachten, sondern eher als beste Variante der experimentell ermittelten Daten. Zusätzlich gab die Kristallstruktur nur wenig Aufschluss über dynamische Prozesse in Proteinen (Kirby & Hollfelder 2009, van der Kamp *et al.* 2008).

Die aufgeführten Punkte könnten die Schwierigkeiten erklären, die beim Docking aufgetreten sind.

Eine weitere Bearbeitung des Modells bzw. die Nutzung anderer Programme könnten eine Verbesserung der Docking-Simulationen ergeben. Ebenso ist eine Validierung der Qualität eines Modells mit Hilfe verschiedener Programme möglich, so zum Beispiel mit PROCHECK oder PROSAIL (Laskowski *et al.* 1996, Sippl 1995). Dabei sollten auch immer experimentell ermittelte Daten einbezogen werden, um die Docking-Ergebnisse zu überprüfen.

Eine Schwierigkeit beim Docking stellte das S-Adenosyl-Homocystein dar. Beispielsweise bei Dockingexperimenten in die CCMT wurden die Experimente nicht mit SAM sondern mit SAH durchgeführt (Kapteyn *et al.* 2007). Grund dafür war die Instabilität des SAM, weshalb zur Kristallisation der *C. b.* SAMT SAH verwendet wurde (Zubieta *et al.* 2003). SAM besitzt eine sehr reaktive Methylthiol-Gruppe, die aufgrund ihrer positiven Partialladung eine anziehende Wirkung auf die deprotonierte Carboxylgruppe des Substrates hat und somit auch zur räumlichen Ausrichtung des Substrates beitragen kann (Fauman *et al.* 1999). Beim Docking mit SAH fehlte diese reaktive Gruppe, was eine wichtige Einflussgröße im aktiven Zentrum nicht berücksichtigte.

4.6. Kristallisation der *Hoya carnosa* SAMT

Da das Homologie-Modell einen guten Einblick in die dreidimensionale Struktur der *H. c.* SAMT lieferte, die Qualität jedoch nicht für Docking-Experimente ausreichte, wurde die exakte Ermittlung der Struktur mittels eines hochauflösenden Kristalls angestrebt.

Neben der *C. b.* SAMT gelang es die Struktur der IAMT1 (Indol-3-Essigsäure-Methyltransferase, Zhao *et al.* 2008) aus *Arabidopsis thaliana* sowie die XMT (Xanthosin-Methyltransferase) und DXMT (Dimethylxanthin-Methyltransferase, McCarthy *et al.* 2007) aus *Coffea canephora* röntgenkristallographisch zu ermitteln. Die Röntgenkristallographie ist derzeit die wichtigste Technik zur Strukturaufklärung von Proteinen. Hierzu ist eine große Proteinmenge von hoher Reinheit erforderlich. In dieser Arbeit konnten ausreichende Mengen der *H. c.* SAMT1 aufgereinigt werden. Auch der TEV-Verdau zur Abspaltung des His-Tag konnte im großen Ansatz realisiert werden. Bei der anschließenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie blieben jedoch Reste der TEV-Protease, des nicht gespaltenen Proteins sowie des His-Tag zurück. Hier wäre eine weitere Optimierung der Aufreinigung möglich, beispielsweise durch Variationen der Imidazolkonzentrationen, der Proteinmenge je Säulenvolumen oder der Waschvolumina. Einen weiteren, kritischen Schritt stellte die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen dar. Dabei war darauf zu achten, dass Materialien

verwendet wurden, welche für große Proteinmengen geeignet sind und eine Aggregation von Proteinen verhindern. Durch Aggregation können große Mengen an Protein verloren gehen.

Um eine hohe Reinheit der Proteine zu gewährleisten, wurde eine Gelchromatographie angeschlossen. Wie in den Ergebnissen zu sehen (Abb. 3-29) reichte die Auftrennung der Probe nicht aus, um verlustarm Fraktionen für die Kristallisation zu sammeln. Hier ist eine weitere Optimierung nötig, wobei die Kapazität der Säule, das Säulenmaterial und der Säulendurchmesser ausgetestet und optimiert werden müssen.

Derzeit finden Versuche der Kristallisation der *H. c. SAMT1* in der Abteilung Physikalische Biotechnologie der Universität Halle statt. Bisher wurde eine Aggregation der Proteine beobachtet, jedoch noch keine Kristallbildung. Für die Röntgenstrukturanalyse sind jedoch hochgeordnete Kristalle einer bestimmten Größe nötig. Die Austestung der Kristallisationsbedingungen und das Wachstum von Kristallen können sehr zeitaufwändig sein.

5. Zusammenfassung

Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der *C. b.* SAMT wurde die Grundlage zur Struktur- und Funktionsanalyse der AS des aktiven Zentrums der *H. c.* SAMT gelegt. AS-Substitutionen sollten die Bedeutung einzelner AS des aktiven Zentrums für die Substratspezifität und die Größe des Substratspektrums aufklären. Mutationen an den Resten Met156, Val231, Val321 und Phe357 wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Spezifität für BA zu erhöhen und im Idealfall eine BSMT zu erzeugen. Die Reste Leu216 und Trp232 wurden mutiert, um Enzyme mit einem großen Substratspektrum zu erzeugen.

In dieser Arbeit wurden neben den bereits untersuchten *H. c.* SAMT1 und 2 ein weiteres Enzym, die *H. c.* SAMT3, identifiziert und charakterisiert. Diese unterschied sich von der *H. c.* SAMT1 an der AS-Position 216, einer AS in direkter Nähe zum aktiven Zentrum. Die *H. c.* SAMT3 besaß eine geringere Spezifität für SA, was die Bedeutung von Resten außerhalb des aktiven Zentrums für die Substratbindung untermauerte. Für das Vorhandensein der SAMT3 in der Blüte von *H. c.* sprach die nachgewiesene Emission des Methylesters der 2-Methoxy-BA (Heidebrecht 2005).

Die Untersuchung der Mutanten zeigte, dass die Met156His-Mutation der SAMT3 zu einem Enzym mit einem vergrößerten Substratspektrum sowie einer deutlichen Verschiebung der Eigenschaften in Richtung BSMT führte. So zeigte die Mutante BSMT-typische Substratumsätze und K_M -Werte. Aber erst die zusätzliche Mutation Leu216Met in der SAMT1-Doppelmutante Met156His+Leu216Met führte zur bevorzugten Umsetzung von BA. Eine deutliche Verkleinerung des Substratspektrums bewirkten die Leu216Met- und Val231Phe-Mutationen der SAMT1 und 3. Die Mutationen Val231Ile und Phe357Tyr der SAMT3 bewirkten nur geringfügige Veränderungen des Substratspektrums. Trp232 und Val321 zeigten sich als essenzielle Reste für die Funktionsfähigkeit der *H. c.* SAMT. Die Position 357 erforderte eine phenolische Komponente, wobei das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am Aromaten keine Änderung des Enzymtyps bewirkte.

Zusammenfassend konnte nur für den Rest 156 (Met oder His) eine Bedeutung zur Diskriminierung von SA und BA nachgewiesen werden. Histidin bewirkte ebenfalls eine große Akzeptanz verschiedener Substrate.

Homologiemodelle der *H. c.* SAMT-Wildtypen und Mutanten dienten der Veranschaulichung von Veränderungen im aktiven Zentrum. Docking-Experimente mit verschiedenen Substraten in die modellierten Enzyme erbrachten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher wurde die *H. c.* SAMT1 in großen Mengen aufgereinigt und Versuche zur Ermittlung der exakten Struktur mittels Röntgenkristallographie vorbereitet.

- Arimura G.-I., Matsui K., & Takabayashi J.** (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant cell physiology*, 50(5), 911-923.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., & Schwede T.** (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(2), 195-201.
- Barkman T. J., Martins T. R., Sutton E., & Stout J. T.** (2007). Positive selection for single amino acid change promotes substrate discrimination of a plant volatile-producing enzyme. *Molecular biology and evolution*, 24(6), 1320-9.
- Beckers G. J., & Spoel S. H.** (2005). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biology*, 8, 1-10.
- Binder R. G., & Flath R. A.** (1989). Volatile components of pineapple guava. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 734-736.
- Blum H., Beier H., & Gross H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chen F., D'Auria J. C., Tholl D., Ross J. R., Gershenzon J., Noel J. P., & Pichersky E.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The Plant Journal*, 36(5), 577-588.
- Chenna R.** (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3497-3500.
- Daayf F., Ongena M., Boulanger R., El Hadrami I., & Bélanger R. R.** (2000). Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Journal of chemical ecology*, 26(7), 1579–1593.
- D'Auria J. C., Chen F., & Pichersky E.** (2003). Chapter eleven: The SABATH family of MTS in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. In J. T. Romeo (Ed.), *Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology* (Vol. 37, pp. 253-283). Elsevier.

- Effmert U., Saschenbrecker S., Ross J., Negre F., Fraser C. M., Noel J. P., Dudareva N., et al.** (2005). Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: From in vitro to in planta function. *Phytochemistry*, 66, 1211-1230.
- Englebienne P., Fiaux H., Kuntz D. A., Corbeil C. R., Gerber-Lemaire S., Rose D. R., & Moitessier N.** (2007). Evaluation of docking programs for predicting binding of Golgi alpha-mannosidase II inhibitors: a comparison with crystallography. *Proteins*, 69(1), 160-176.
- Eom S., Yang H., & Weston L.** (2006). An Evaluation of the Allelopathic Potential of Selected Perennial Groundcovers: Foliar Volatiles of Catmint (*Nepeta × faassenii*) Inhibit Seedling Growth. *Journal of Chemical Ecology*, 32(8), 1835-1848.
- Fauman E. B., Blumenthal R. M., & Cheng X.** (1999). Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases. In X. Cheng Blumenthal, R. M. (Ed.), (pp. 1-38). NY: World Scientific Publishing.
- Feike J.** (2007). Charakterisierung funktioneller Aminosäuren in der Benzoessäure/Salizylsäure:S'-Adenosyl-L-Methionin- Carboxylmethyltransferase (BSMT) von *Nicotiana suaveolens*. Diplomarbeit, Universität Rostock
- Ferreira V., Aznar M., López R., & Cacho J.** (2001). Quantitative Gas Chromatography–Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4818-4824.
- Freydank A.-C., Brandt W., & Dräger B.** (2008). Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins*, 72(1), 173-83.
- Gang David R.** (2005). Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 301-325.
- Ginalski K.** (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 16(2), 172-7.
- Guex N., & Peitsch M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-23.
- Halim V. A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., & Rosahl S.** (2007). Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(11), 1346-52.

- Hattori M., Sakagami Y., & Marumo S.** (1992). Oviposition Deterrents for the Limabean Pod Borer, *Etiella zinckenella* (TREITSCHKE)(Lepidoptera: Pyralidae) from *Populus nigra* Lcv *Italica* Leaves. *Applied entomology and zoology*, 27(2), 195–204.
- Heidebrecht D.** (2005). *Untersuchungen zur Methylsalicylat-Emission aus Hoya carnosa und biochemische Charakterisierung der S-Adenosyl-L-Methionin: Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferase*. Diplomarbeit, Universität Rostock.
- Hildebrand P. W., Goede A., Bauer R. A., Gruening B., Ismer J., Michalsky E., & Preissner R.** (2009). SuperLooper--a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue), W571-4.
- Hippauf F., Michalsky E., Huang R., Preissner R., Barkman T. J., & Piechulla B.** (2010). Enzymatic, expression and structural divergences among carboxyl O-methyltransferases after gene duplication and speciation in Nicotiana. *Plant molecular biology*, 72(3), 311-30.
- Hoballah M. E., Stuurman J., Turlings T. C. J., Guerin P. M., Connétable S., & Kuhlemeier C.** (2005). The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*, 222(1), 141-50.
- Honda K., & Ômura H.** (1998). Identification of floral volatiles from Ligustrum japonicum that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(12), 2167-2180.
- Horiuchi J., Badri D. V., Kimball B., Negre F., Dudareva N., Paschke M. W., & Vivanco J. M.** (2007). The floral volatile, methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 226(1), 1-10.
- Huang R., Hippauf F., Rohrbeck D., Haustein M., Wenke K., Feike J., Piechulla B., et al.** (2012). Enzyme functional evolution through improved catalysis of ancestrally non-preferred substrates. *PNAS in press*.
- James D. G.** (2003). Field Evaluation of Herbivore-Induced Plant Volatiles as Attractants for Beneficial Insects: Methyl Salicylate and the Green Lacewing, *Chrysopa nigricornis*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(7), 1601-1606.
- James D. G., & Price T. S.** (2004). Field-Testing of Methyl Salicylate for Recruitment and Retention of Beneficial Insects in Grapes and Hops. *Journal of Chemical Ecology*, 30(8), 1613-1628.
- Kappers I. F., Hoogerbrugge H., Bouwmeester H. J., & Dicke M.** (2011). Variation in herbivory-induced volatiles among cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties has

- consequences for the attraction of carnivorous natural enemies. *Journal of chemical ecology*, 37(2), 150-60.
- Kapteyn J., Qualley A. V., Xie Z., Fridman E., Dudareva N., & Gang D. R. (2007).** Evolution of Cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant cell*, 19(10), 3212-29.
- Kato M., Mizuno K., Fujimura T., Iwama M., Irie M., Crozier A., & Ashihara H. (1999).** Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant physiology*, 120(2), 579-86.
- Kessler D., & Baldwin I. T. (2007).** Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49(5), 840-54.
- Kirby B. A. J., & Hollfelder F. (2009).** Chapter 1: From Models Through Mimics to Artificial Enzymes. *From Enzyme Models to Model Enzymes*. Published by the Royal Society of Chemistry (pp. 1-28)
- Kniskern J. M., Traw M. B., & Bergelson J. (2007).** Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Defense Pathways Reduce Natural Bacterial Diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(12), 1512-1522.
- Knudsen J. T., Eriksson R., Gershenzon J., & Ståhl B. (2006).** Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review*, 72(1), 1-120.
- Krohn K. (2005).** Km-Wert-Bestimmung der S-Adenosyl-L-Methionin:Salizylsäure Carboxyl Methyltransferase (SAMT) aus *Hoya carnosa*. *Diplomarbeit*, Universität Rostock
- Köllner T. G., Lenk C., Zhao N., Seidl-Adams I., Gershenzon J., Chen F., & Degenhardt J. (2010).** Herbivore-induced SABATH methyltransferases of maize that methylate anthranilic acid using s-adenosyl-L-methionine. *Plant physiology*, 153(4), 1795-807.
- Laskowski R. A., Rullmann J. A., MacArthur M. W., Kaptein R., & Thornton J. M. (1996).** AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, 8(4), 477-486.
- Lottspeich F., & Zorbas H. (1998).** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Mallinger R. E., Hogg D. B., & Gratton C. (2011).** Methyl Salicylate Attracts Natural Enemies and Reduces Populations of Soybean Aphids (*Hemiptera: Aphididae*) in Soybean Agroecosystems. *Journal of Economic Entomology*, 104(1), 115-124.

- Mizuno K., Okuda A., Kato M., Yoneyama N., Tanaka H., Ashihara H., & Fujimura T. (2003).** Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.)1. *FEBS Letters*, 534(1-3), 75-81.
- Murata J., Roepke J., Gordon H., & De Luca V. (2008).** The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *The Plant cell*, 20(3), 524-42.
- Murfitt L. M., Kolosova N., Mann C. J., & Dudareva N. (2000).** Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 382(1), 145-51.
- Noel J. P., Dixon R. A., Pichersky E., Zubieta C., & Ferrer J.-L. (2003).** Chapter two Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In J. T. R. B. T.-R. A. in *Phytochemistry (Ed.), Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology* (Vol. 37, pp. 37-58). Elsevier.
- Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., & Klessig D. F. (2007).** Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5847), 113-6.
- Pichersky E., & Gang D. R. (2000).** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-45.
- Pichersky E., Noel J. P., & Dudareva N. (2006).** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), 808-11.
- Pichersky E., Raguso R. A., Lewinsohn E., & Croteau R. (1994).** Floral scent production in *Clarkia (Onagraceae)*(I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity). *Plant Physiology*, 106(4), 1533.
- Pott M. B. (2003).** Molekulare und biochemische Regulation der Emission von Blütenduftstoffen. *Doktorarbeit*, Universität Rostock
- Pott M. B, Hippauf F., Saschenbrecker S., Chen F., Ross J., Kiefer I., Slusarenko A., et al. (2004).** Biochemical and Structural Characterization of Benzenoid Carboxyl Methyltransferases Involved in Floral Scent Production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiology*, 135(August), 1946-1955.

- Rabilloud T., Carpentier G., & Tarroux P.** (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6), 288-91.
- Raguso R. A., Light D. M., & Pickersky E.** (1996). Electroantennogram responses of *Hyles lineata* (Sphingidae: Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers. *Journal of Chemical Ecology*, 22(10), 1735–1766.
- Raguso R. a., & Light D. M.** (1998). Electroantennogram responses of male *Sphinx perelegans* hawkmoths to floral and “green-leaf volatiles.” *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(3), 287-293.
- Rasgado M. A., Malo E. A., Cruz-López L., Rojas J. C., & Toledo J.** (2009). Olfactory Response of the Mexican Fruit Fly (*Diptera: Tephritidae*) to *Citrus aurantium* Volatiles. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 585-594.
- Ribnicky D., Shulaev V., & Raskin I.** (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant physiology*, 118(2), 565-72.
- Ross J. R., Nam K. H., D’Auria J. C., & Pichersky E.** (1999). S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 367(1), 9-16.
- Scalliet G., Piola F., Douady C. J., Réty S., Raymond O., Baudino S., Bordji K., et al.** (2008). Scent evolution in Chinese roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5927-32.
- Schenk P. M., Baumann S., Mattes R., & Steinbiss H. H.** (1995). Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs. *Biotechniques*, 19(2), 196-198,200.
- Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., Lee Y. W., Hwang I., Lee J. S., et al.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4788-93.
- Shulaev V., Silverman P., & Raskin I.** (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *nature*, 385, 718-721.
- Sippl M. J.** (1995). Knowledge-based potentials for proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 5(2), 229-235.

- Stryer L.** (1999). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*, 4. Auflage.
- Teuber M., Azemi M. E., Namjoyan F., Meier A.-C., Wodak A., Brandt W., & Dräger B.** (2007). Putrescine N-methyltransferases--a structure-function analysis. *Plant molecular biology*, 63(6), 787-801.
- Thielges M. C., Chung J. K., Axup J. Y., & Fayer M. D.** (2011). Influence of histidine tag attachment on picosecond protein dynamics. *Biochemistry*, 50(25), 5799-805.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., & Higgins D. G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 25(24), 4876-82.
- Tieman D., Zeigler M., Schmelz E., Taylor M. G., Rushing S., Jones J. B., & Klee H. J.** (2010). Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant J.*, 62(1), 113-123
- Ulland S., Ian E., Mozuraitis R., Borg-Karlson A.-K., Meadow R., & Mustaparta H.** (2008). Methyl salicylate, identified as primary odorant of a specific receptor neuron type, inhibits oviposition by the moth *Mamestra brassicae* L. (*Lepidoptera, noctuidae*). *Chemical senses*, 33(1), 35-46.
- Vallad G. E. G., & Robert M.** (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop science*, 44, 1920-1934.
- Verdonk M. L., Cole J. C., Hartshorn M. J., Murray C. W., & Taylor R. D.** (2003). Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 52(4), 609-23.
- Vogt T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.
- Wang Y., Address K. J., Chen J., Geer L. Y., He J., He S., Lu S., et al.** (2007). MMDB: annotating protein sequences with Entrez's 3D-structure database. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), D298-300.
- Wasternack C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681-97.
- Wenke K., Kai M., & Piechulla B.** (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231(3), 499-506.

- Wildermuth M. C.** (2006). Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 288-96.
- Yang H., Ahn J.-H., Jeong K. J., Lee S., & Lim Y. (2003).** The Homodimerization of *Thalictrum tuberosum* O-Methyltransferases by Homology-based Modelling. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24(9), 1256-1260.
- Yang Y., Yuan J. S., Ross J., Noel J. P., Pichersky E., & Chen F.** (2006). An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448(1-2), 123-132.
- Zhao N., Guan J., Lin H., & Chen F.** (2007). Molecular cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid methyltransferase from poplar. *Phytochemistry*, 68(11), 1537-1544.
- Zhao N., Ferrer J.-L., Ross J., Guan J., Yang Y., Pichersky E., Noel J. P., et al.** (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. *Plant physiology*, 146(2), 455-67.
- Zubieta C., Ross J. R., Koscheski P., Yang Y., Pichersky E., & Noel J. P.** (2003). Structural Basis for Substrate Recognition in the Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family. *The Plant cell*, 15(August), 1704-1716.

7. Anhang

7.1. Nucleotidsequenzen der SAMT1 und 3

SAMT1

ATGGAAGTTGTTGATGTTCTTCACATGAATGGTGGCATTGGAGATGCAAGCTATGCAAGCAACTCCT
TGGTTCAAAAAATGGTTATACTATTGGCAAAGCCAATAACAGAAGAAGCCATCACTGAACTCTACAC
CAGACTCTTCCCAAAATCAATATGCATCGCAGATTGGGTTGCTCAAGTGGACCAAACACCTTCTTAG
CAGTATCTGAACTGATCAAAGATGTTGAAAAGAAGTGCAAAAGTTTAGGACACAAATCACCGGAGT
ACCAGATTTACTTGAATGATCTTCCCAGCAATGATTTCAACACCATTTTCAAATCTCTTCTAGCTTCCA
GAAAAGTTTTGCCGAGCAGATGGGTTCTGGCTTTGGTCATTGTTTCTTTACCGGAGTCCCCGGTTCAT
TCTACGGAAGACTATTTCCCAACAAAAGTCTCCATTTTGTTCACTCATCTTATAGTGTGATGTGGCTTT
CTCGGGTTCCTGATTTGGAAGAGGTTAACAAAGGCAACATCTACTTGTCAAGCACAAGCCCACTCAG
TGTGATAAGTTCATACTTGAAGCAATTCCAGAGAGATTTTACAACCTTTTCTGCAATGTCGAGCAGAGG
AATTGGTTCCCGGCGGGGTTATGGTGTTAACATTTTAGGGAGAAAAAGTGAAGATCATTAGGCAA
GGAGAGTGGCTATGTGTGGGAGCTTTTAGCTAGGGCCCTCAATGAATTGGTTTCTGAGGGGCAAATT
GAGGAAGAACAACCTCGACTGCTTTAACATTCTCAATACACACCATCACCAGCAGAAGTGAAATACTT
TGTGGAAGAAGAAGGATCTTTCTCGATAACTCGACTCGAGGCCACAACAATCCACTGGACTGCGTAT
GATCACGATCATGATCATGTGACTGGTCATCATCATGCATTCAAAGATGGCGGATACAGTGTTTCGA
ATTGCATGAGAGCCGTGGCGGAACCTTGCTGGTTAGTCACTTTGGAGAAGCCATAATGGACGAGG
TTTTCCGTAAGTACAGAGAAATACTTACGGATTGCATGACCAAAGAGAAGACTGAGTTCATCAATGT
CACCGTCTCCATGACCAGAAGGGTT

SAMT3

ATGGAAGTTGTTGATGTTCTTCACATGAATGGTGGCATTGGAGATGCAAGCTATGCAAGCAACTCCT
TGGTTCAAAAAATGGTTATACTATTGGCAAAGCCAATAACAGAAGAAGCCATCACTGAACTCTACAC
CAGACTCTTCCCAAAATCAATATGCATCGCAGATTGGGTTGCTCAAGTGGACCAAACACCTTCTTAG
CAGTATCTGAACTGATCAAAGATGTTGAAAAGAAGTGCAAAAGTTTAGGACACAAATCACCGGAGT
ACCAGATTTACTTGAATGATCTTCCCAGCAATGATTTCAACACCATTTTCAAATCTCTTCTAGCTTCCA
GAAAAGTTTTGCCGAGCAGATGGGTTCTGGCTTTGGTCATTGTTTCTTTACCGGAGTCCCCGGTTCAT
TCTACGGAAGACTATTTCCCAACAAAAGTCTCCATTTTGTTCACTCATCTTATAGTGTGATGTGGCTTT
CTCGGGTTCCTGATTTGGAAGAGGTTAACAAAGGCAACATCTACTTGTCAAGCACAAGCCCACTCAG
TGTGATAAGTTCATACTTGAAGCAATTCCAGAGAGATTTTACAACCTTTTCTGCAATGTCGAGCAGAGG
AATTGGTTCCCGGCGGGGTTATGGTGTTAACCATTTAGGAAGAAAAAGTGAAGATCATTAGGCAA
GGAGAGTGGCTATGTGTGGGAGCTTTTAGCTAGGGCCCTCAATGAATTGGTTTCTGAGGGGCAAATT
GAGGAAGAACAACCTCGACTGCTTTAACATTCTCAATACACACCATCACCAGCAGAAGTGAAATACTT
TGTGGAAGAAGAAGGATCTTTCTCGATAACTCGACTCGAGGCCACAACAATCCACTGGACTGCGTAT
GATCACGATCATGATCATGTGACTGGTCATCATCATGCATTCAAAGATGGCGGATACAGTGTTTCGA
ATTGCATGAGAGCCGTGGCGGAACCTTGCTGGTTAGTCACTTTGGAGAAGCCATAATGGACGAGG
TTTTCCGTAAGTACAGAGAAATACTTACGGATTGCATGACCAAAGAGAAGACTGAGTTCATCAATGT
CACCGTCTCCATGACCAGAAGGGTT

7.2. Proteinsequenzen der SAMT1 und 3

SAMT1

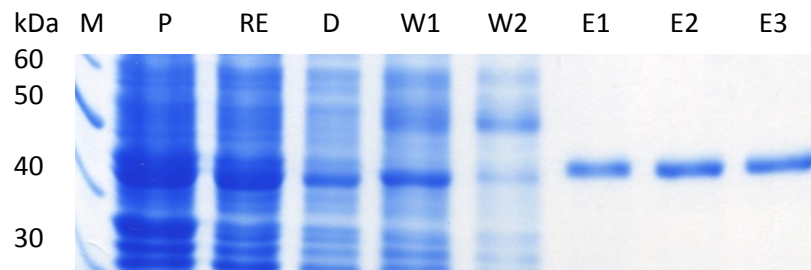
MEVVDVLHMNGGIGDASYASNSLVQKMVILLAKPITEEAITELYTRLFPKSICIADLGCSGPNTFLAVSELI
KDVEKKCKSLGHKSPEYQIYLNDLPSNDFNTIFKSLPSFQKSFAEQMGSGFGHCFFTGVPGSFYGRFPNK
SLHFVHSSYSVMWLSRVPDLEEVNKGNIYLSSTSPLSVISSYLKQFQRDFTTFLQCRAEELVPGGVMVLTFL
GRKSEDHSGKESGYVWELLARALNELVSEGQIEEEQLDCFNIPQYTPSPAEVKYFVEEEGSFSITRLEATTIH
WTAYDHDHHDHVTGHHHAFKDGGSVSNMRAVAEPLLVSFHGEAIMDEVFRKYREILTDCMTKEKTEFI
NVTVSMTRRV

SAMT3

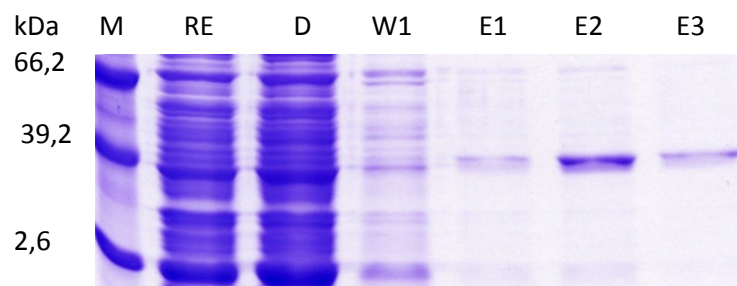
MEVVDVLHMNGGIGDASYASNSLVQKMVILLAKPITEEAITELYTRLFPKSICIADLGCSGPNTFLAVSELI
KDVEKKCKSLGHKSPEYQIYLNDLPSNDFNTIFKSLPSFQKSFAEQMGSGFGHCFFTGVPGSFYGRFPNK
SLHFVHSSYSVMWLSRVPDLEEVNKGNIYLSSTSPLSVISSYLKQFQRDFTTFLQCRAEELVPGGVMVLTIL
GRKSEDHSGKESGYVWELLARALNELVSEGQIEEEQLDCFNIPQYTPSPAEVKYFVEEEGSFSITRLEATTIH
WTAYDHDHHDHVTGHHHAFKDGGSVSNMRAVAEPLLVSFHGEAIMDEVFRKYREILTDCMTKEKTEFI
NVTVSMTRRV

7.3. Coomassie gefärbte Gele affinitätschromatographisch aufgereinigter Proteine

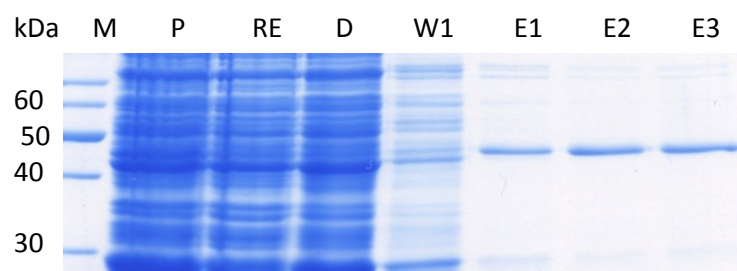
Met156His (M page ruler unstained, Fermentas)



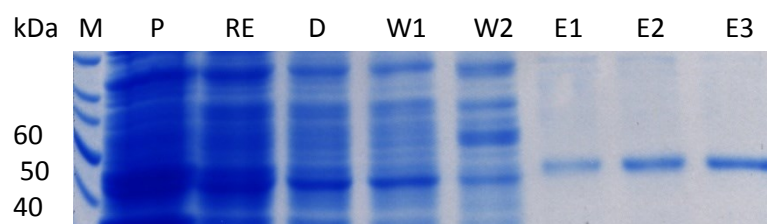
Leu216Met (M premixed protein molecular weight marker, low range ROCHE)



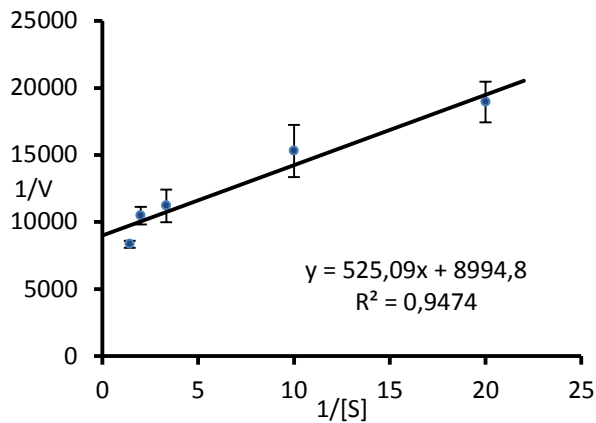
Val231Ile (M page ruler unstained, Fermentas)



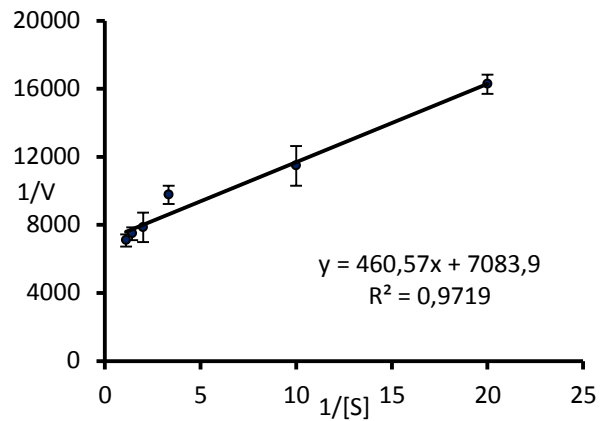
Met156His+Leu216Met (M page ruler unstained, Fermentas)



7.4. K_M -Wert Bestimmungen für SA, Lineweaver-Burk-Diagramme SAMT3

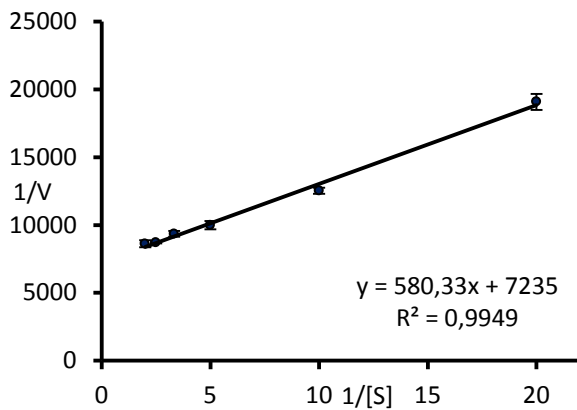


0,25 µg Protein, 30 min Inkubation bei RT
 $K_M = 58 \mu M$ $V_{max} = 0,111 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,015 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 260,7 s^{-1} M^{-1}$

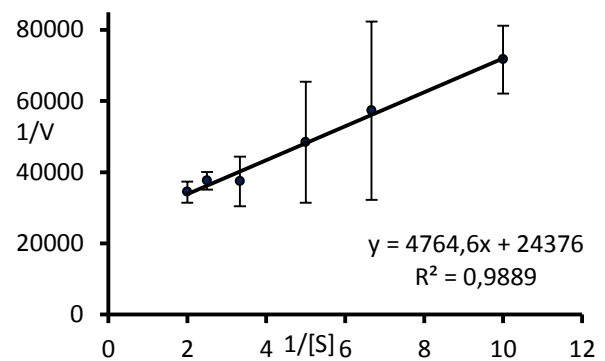


0,25 µg Protein, 30 min Inkubation bei RT
 $K_M = 65 \mu M$ $V_{max} = 0,141 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0192 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 295,5 s^{-1} M^{-1}$

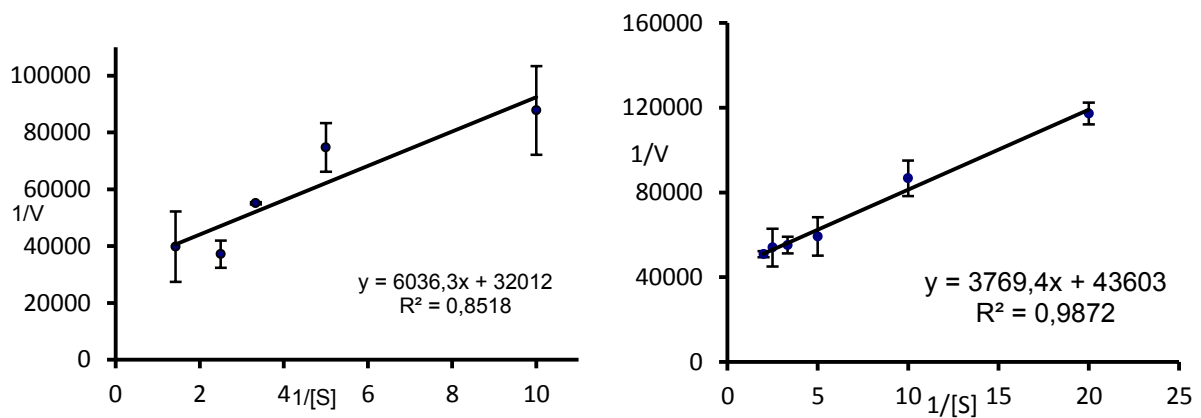
Met156His



1 µg Protein, 12 min Inkubation bei RT
 $K_M = 80 \mu M$ $V_{max} = 0,138 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0048 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 59,3 s^{-1} M^{-1}$

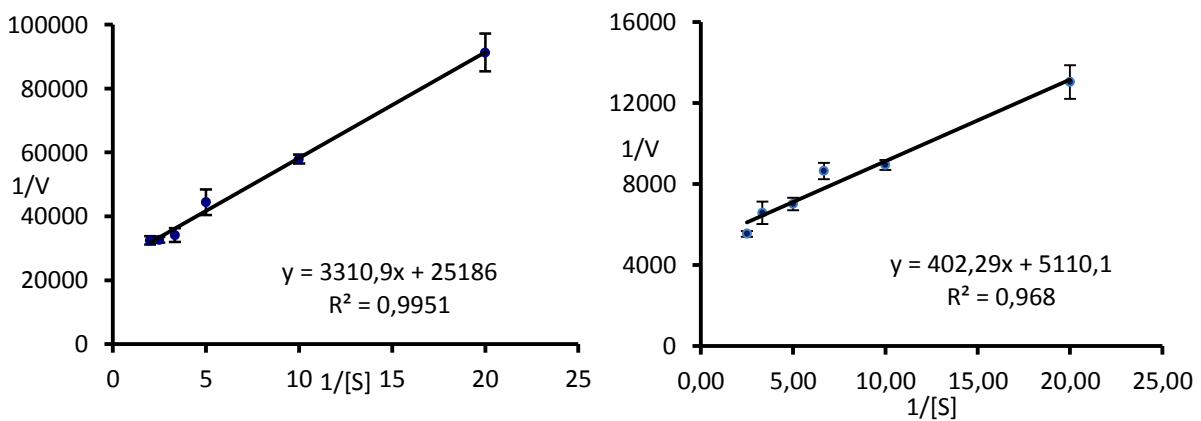


1 µg Protein, 6 min Inkubation bei RT
 $K_M = 196 \mu M$ $V_{max} = 0,041 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0048 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 59,3 s^{-1} M^{-1}$

Leu216Met

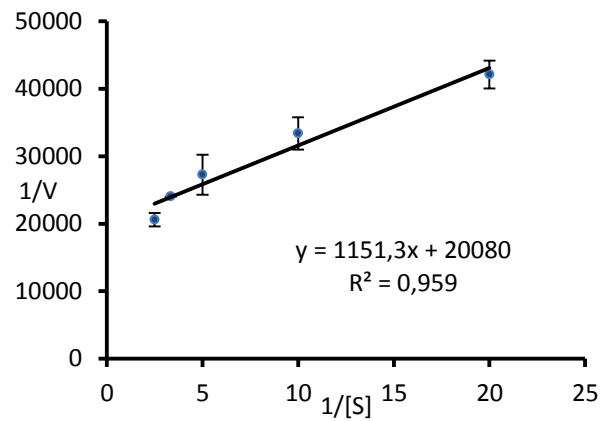
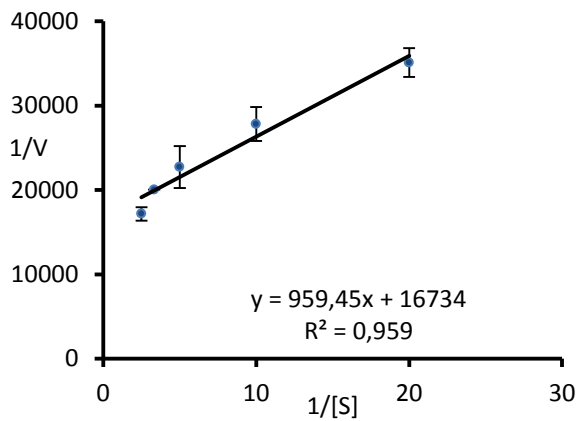
0,36 μg Protein, 15 min Inkubation bei RT
 $K_M = 189 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,031 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_{\text{cat}} = 0,003 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 16,1 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

1,5 μg Protein, 15 min Inkubation bei RT
 $K_M = 86 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,0229 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_{\text{cat}} = 0,0053 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 6,1 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

Met156His+Leu216Met

1 μg Protein, 25 min Inkubation bei RT
 $K_M = 131,5 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,0397 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_{\text{cat}} = 0,0014 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 10,41 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

1,5 μg Protein, 25 min Inkubation bei RT
 $K_M = 79 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,196 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_{\text{cat}} = 0,0045 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 57,12 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

Val231Ile

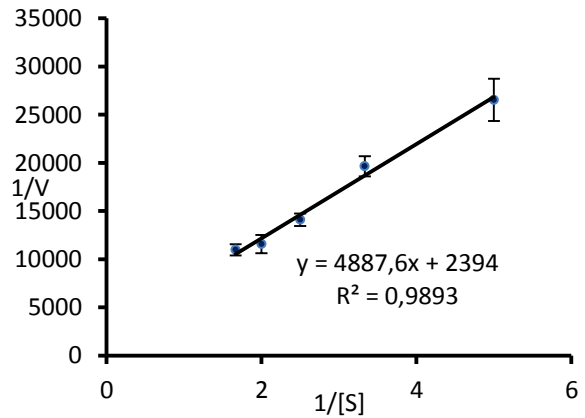
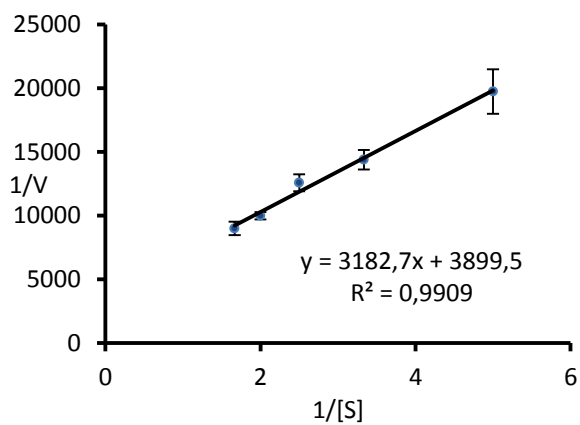
0,5 µg Protein, 30 min Inkubation bei RT

$$K_M = 57 \mu\text{M} \quad V_{\max} = 0,0598 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,004 \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat}}/K_M = 71,9 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$K_M = 57 \mu\text{M} \quad V_{\max} = 0,0498 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,003 \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat}}/K_M = 59,9 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

Val231Phe

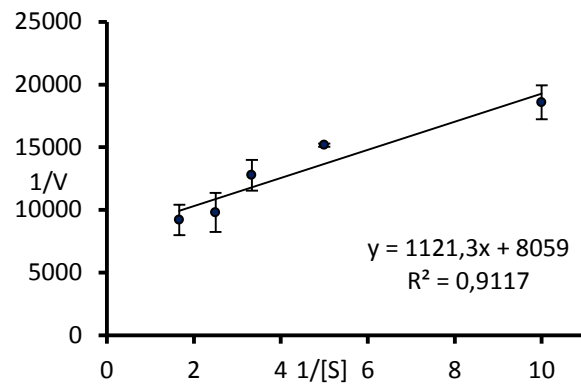
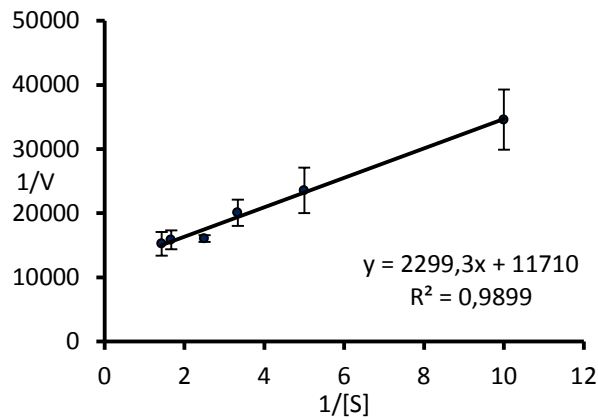
1 µg Protein, 25 min Inkubation bei RT

$$K_M = 816 \mu\text{M} \quad V_{\max} = 0,26 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,009 \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat}}/K_M = 11 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$K_M = 2042 \mu\text{M} \quad V_{\max} = 0,418 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,0144 \text{ s}^{-1} \quad k_{\text{cat}}/K_M = 7,1 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

Phe357Tyr

0,5 μg Protein, 20 min Inkubation bei RT

$K_M = 196 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,085 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

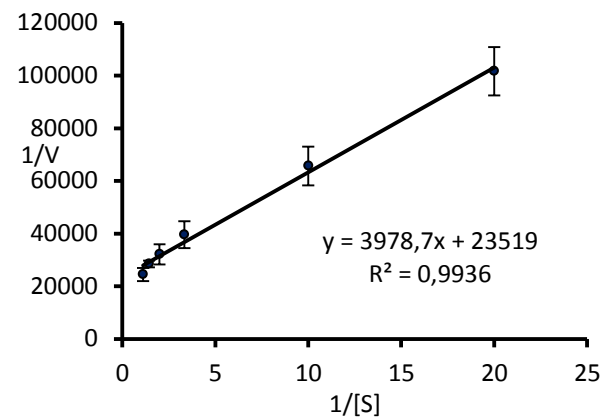
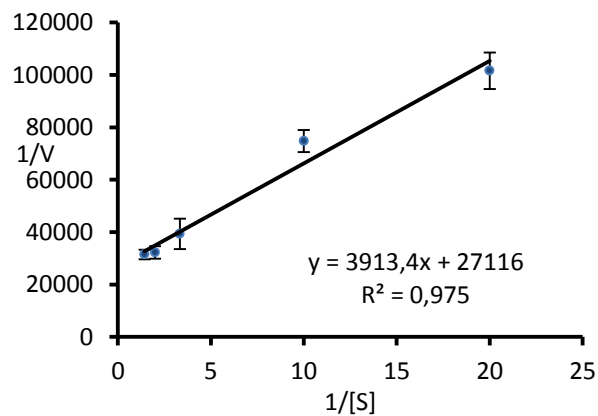
$k_{\text{cat}} = 0,006 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 30 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

0,5 μg Protein, 20 min Inkubation bei RT

$K_M = 139 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,124 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

$k_{\text{cat}} = 0,009 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 65,8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

7.7. K_M -Wert Bestimmungen für Benzoesäure, Lineweaver-Burk-Diagramme

SAMT3

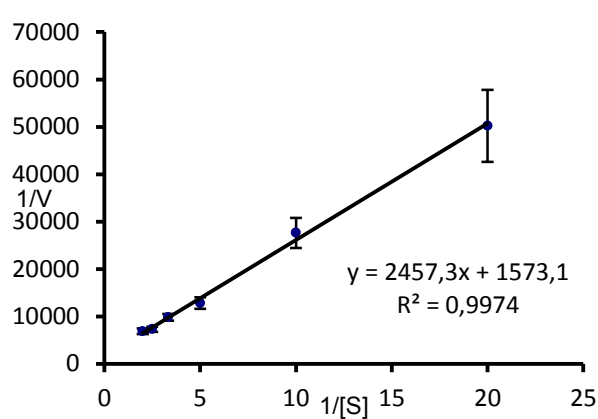
0,25 μg Protein, 30 min Inkubation bei RT

$K_M = 144 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,0369 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

$k_{\text{cat}} = 0,005 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 34,9 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

$K_M = 169 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,0425 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

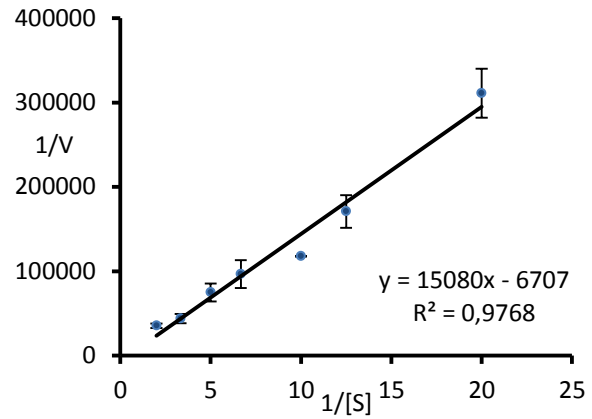
$k_{\text{cat}} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cat}}/K_M = 34,3 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$

Met156His

0,75 µg Protein, 6 min Inkubation bei RT

$K_M = 1562 \mu M$ $V_{max} = 0,636 \mu M \cdot min^{-1}$

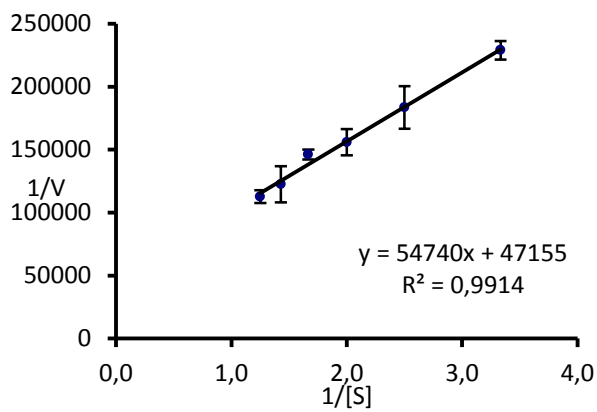
$k_{cat} = 0,029 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 18,7 s^{-1} M^{-1}$



1 µg Protein, 6 min Inkubation bei RT

$K_M = 2248 \mu M$ $V_{max} = 0,1491 \mu M \cdot min^{-1}$

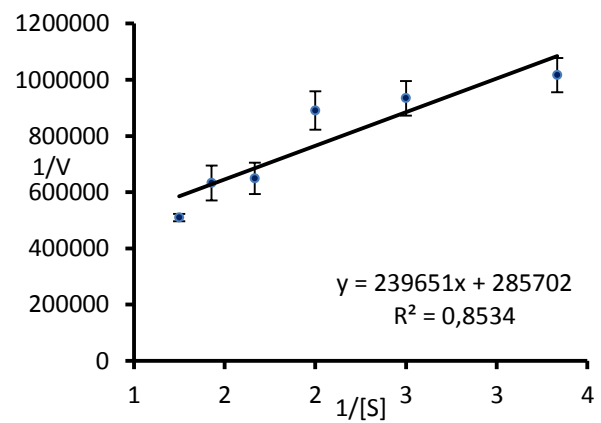
$k_{cat} = 0,0051 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 2,29 s^{-1} M^{-1}$

Leu216Met

1,5 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT

$K_M = 1161 \mu M$ $V_{max} = 0,0212 \mu M \cdot min^{-1}$

$k_{cat} = 0,0005 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 0,42 s^{-1} M^{-1}$

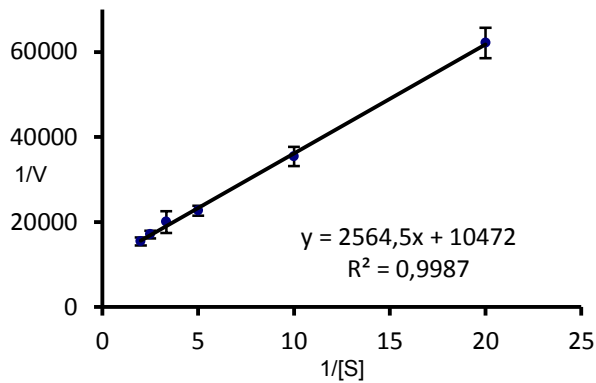


1,5 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT

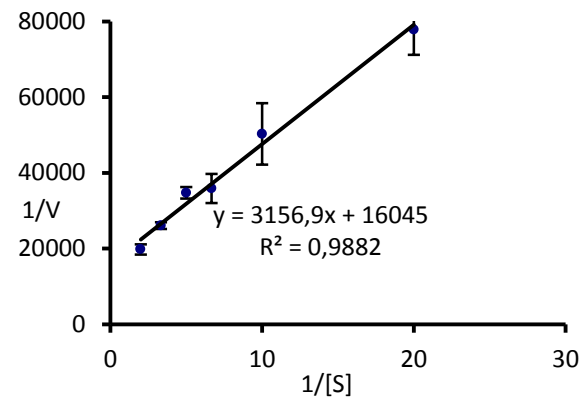
$K_M = 839 \mu M$ $V_{max} = 0,0035 \mu M \cdot min^{-1}$

$k_{cat} = 0,0001 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 0,1 s^{-1} M^{-1}$

Met156His+Leu216Met

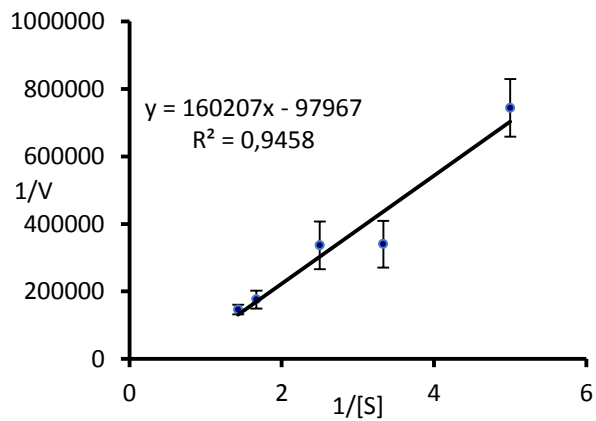


1 µg Protein, 25 min Inkubation bei RT
 $K_M = 245 \mu M$ $V_{max} = 0,0664 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0023 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 9,3 s^{-1} M^{-1}$

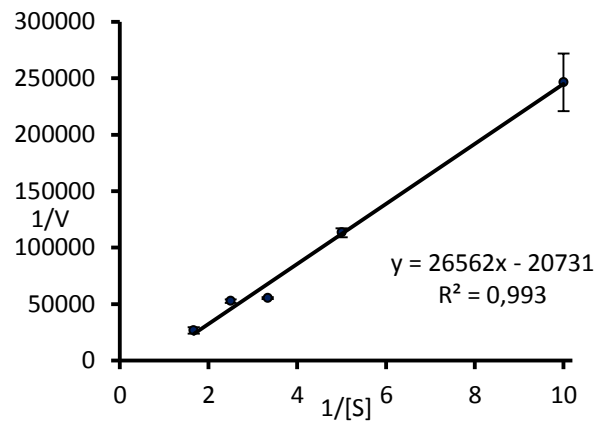


0,75 µg Protein, 25 min Inkubation bei RT
 $K_M = 197 \mu M$ $V_{max} = 0,0623 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0029 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 14,5 s^{-1} M^{-1}$

Val231Ile

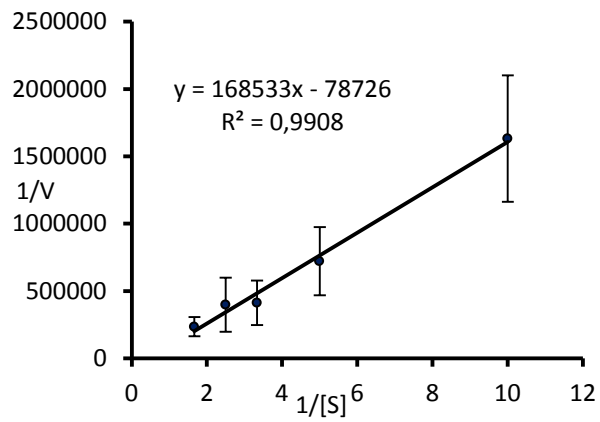


0,69 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT
 $K_M = 1635 \mu M$ $V_{max} = 0,001 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,00005 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 0,03 s^{-1} M^{-1}$

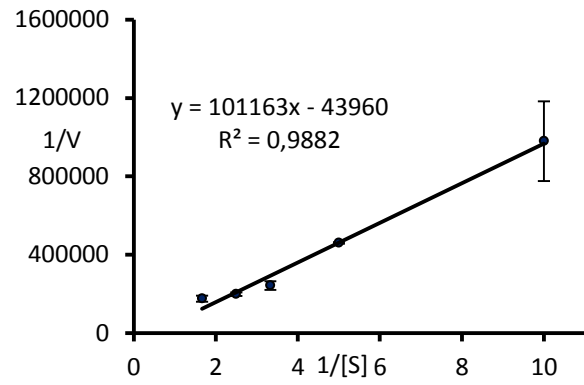


1 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT
 $K_M = 1281 \mu M$ $V_{max} = 0,0482 \mu M \cdot \min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0017 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 1,3 s^{-1} M^{-1}$

Phe357Tyr



0,75 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT
 $K_M = 2141 \mu M$ $V_{max} = 0,013 \mu M \cdot min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,00058 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 0,27 s^{-1} M^{-1}$



1 µg Protein, 20 min Inkubation bei RT
 $K_M = 2301 \mu M$ $V_{max} = 0,023 \mu M \cdot min^{-1}$
 $k_{cat} = 0,0008 s^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 0,3 s^{-1} M^{-1}$

Tab. 7-1: Durch unterschiedliche Linearisierungsverfahren ermittelte K_M - und V_{max} -Werte der *Hoya carnos*a SAMT-Enzyme mit SA und BA, n=2

		Lineweaver-Burk		Eadie-Hofstee		Hanes-Wilkinson	
		K _m [μM]	V _{max} [μM/min]	K _m [μM]	V _{max} [μM/min]	K _m [μM]	V _{max} [μM/min]
SAMT3	SA	58	0,11	61	0,1	102	0,128
		65	0,14	67	0,1	96	0,153
	BA	144	0,037	152	0,04	183	0,04
		169	0,043	181	0,04	204	0,046
SAMT3 Met156His	SA	80	0,138	77	0,1	72	0,13
		165	0,41	233	0,04	249	0,396
	BA	1562	0,636				
		2248	0,149				
SAMT1 Leu216Met	SA	189	0,031			247	0,034
		86	0,0229	89	0,02	79	0,023
	BA	839	0,004				
		1161	0,021	1338	0,02	1000	0,012
SAMT3 Val231Ile	SA	57	0,05	63	0,05	85	0,057
		22	0,021	23	0,02	22	0,022
	BA	1635	0,012				
		1281	0,048	1126	0,04		
SAMT3 Val231Phe	SA	816	0,256			895	0,276
		2040	0,418	1573	0,3		
SAMT3 Phe357Tyr	SA	139	0,12			182	0,084
		196	0,085				
	BA	2301	0,023			946	0,017
		2141	0,013			767	0,011
SAMT1 Met156His+Leu216 Met	SA	79	0,2	83	0,2	107	0,18
		132	0,04	132	0,04	132	0,04
	BA	197	0,06	222	0,07	280	0,08
		245	0,07	237	0,09	241	0,09

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt, ohne fremde Hilfe verfasst, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diana Zol

Danksagung

Frau Prof. Piechulla danke ich für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit in Ihrer Abteilung durchzuführen.

Dr. Uta Effmert danke ich für ihre fachliche und moralische Unterstützung sowie Ihren Glauben an meine Fähigkeiten während der vergangenen Jahre.

Für die praktische Unterstützung bei kritischen Arbeiten während meiner Schwangerschaften danke ich herzlich Claudia Dinse.

Stellvertretend für alle ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiter der Abteilung Biochemie gilt Jana, Martina, Marco, Katrin, Sybille, Frank und Frau Bauer mein Dank für die gute Zusammenarbeit und das in jeglicher Hinsicht bereichernde Umfeld.

Für die Unterstützung an der FPLC-Anlage danke ich Frau Dr. Antje May aus der Abteilung Mikrobiologie.

Dr. Iris Thondorf, Sabine Werner, Dr. Christoph Partier und besonders Christian Ursel vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Docking- und Kristallisationsexperimenten.

Elke Michalsky aus der Arbeitsgruppe Strukturelle Bioinformatik an der Charité Berlin danke ich für die Einweisung in die Modellierung von Biomolekülen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, sowohl meinen Eltern und Geschwistern als auch meinen Mädchen und Jens. Ohne Euren Glauben an mich, eure Kritik und Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.